



**HAL**  
open science

## Filière "protéagineux" état de la recherche

J.P. Boutin, Yves Dronne, S. Ducourneau, J. Le Guen, D. L'Hostis, Nathalie  
Munier-Jolain, Catherine Rameau, B. Tivoli

► **To cite this version:**

J.P. Boutin, Yves Dronne, S. Ducourneau, J. Le Guen, D. L'Hostis, et al.. Filière "protéagineux" état de la recherche. [Rapport de recherche] Inconnu. 2000, 165 p. hal-01893937

**HAL Id: hal-01893937**

**<https://hal.science/hal-01893937>**

Submitted on 11 Oct 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0  
International License

# Filière « Protéagineux »

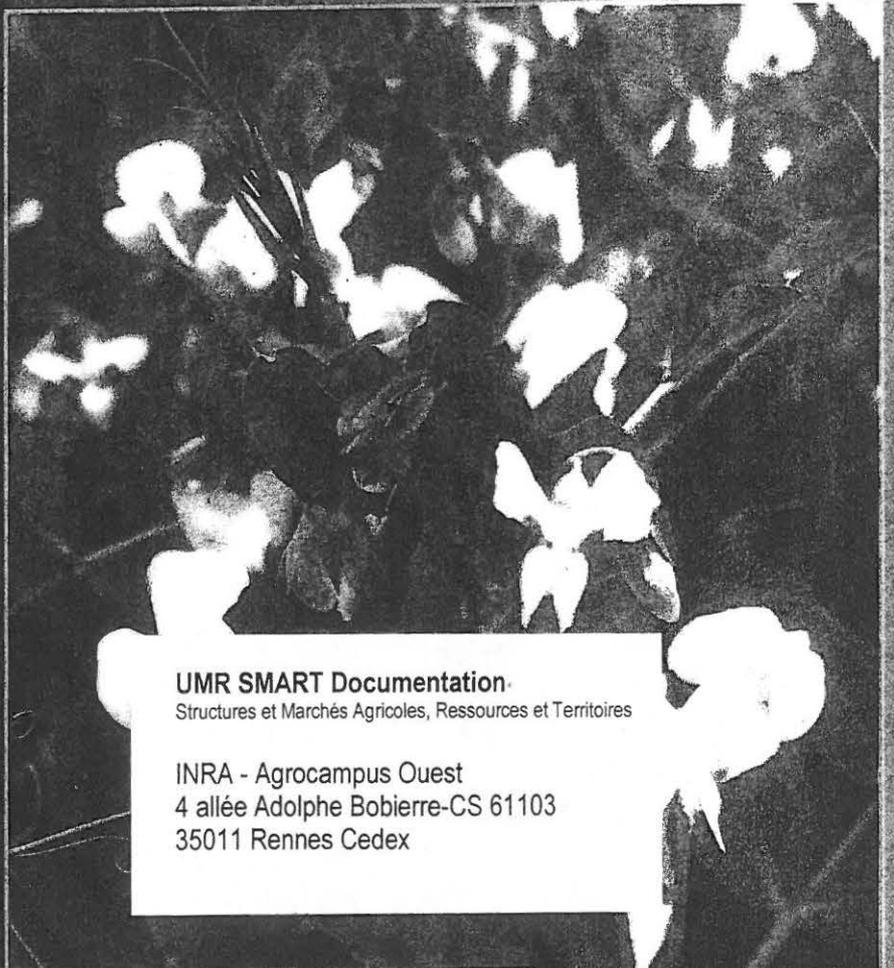
## Etat de la Recherche

### Document Interne INRA

Novembre 2000

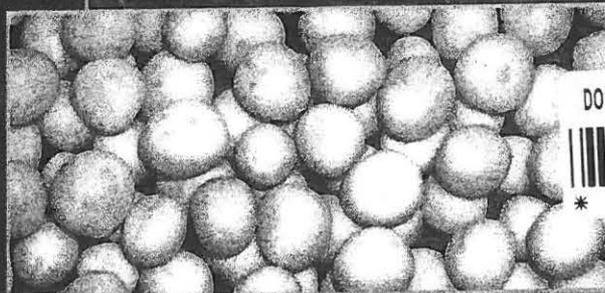
J. Guéguen  
coordonateur

J.P. Boutin  
Y. Dronne  
S. Ducournau  
J. Le Guen  
D. L'Hostis  
N. Munier-Jolain  
C. Rameau  
B. Sève  
B. Tivoli



UMR SMART Documentation  
Structures et Marchés Agricoles, Ressources et Territoires

INRA - Agrocampus Ouest  
4 allée Adolphe Bobierre-CS 61103  
35011 Rennes Cedex



DOCUMENTATION ÉCONOMIE RURALE RENNES



*Pisum sativum L.*

**Les principaux auteurs de ce rapport sont les membres du groupe « Filière protéagineux » :**

**Jean-Pierre BOUTIN  
Yves DRONNE  
Sylvie DUCOURNAU  
Jacques GUEGUEN (coordonateur)  
Joël LE GUEN  
Nathalie MUNIER-JOLAIN  
Bernard SEVE  
Bernard TIVOLI**

auxquels il faut rajouter **C. RAMEAU** pour le chapitre « génomique » et **D. L'HOSTIS** pour la partie « bibliométrie ».

Y ont également largement contribué en apportant leur expertise dans les divers domaines abordés :

**Alain BARANGER, Daniel BOURDON, René BOURNOVILLE,  
Judith BURSTIN, Bernard CARRE, Martine CHAMP, Paul COLONNA,  
Claude PONCET et Henri RULQUIN**

# SOMMAIRE

<b>Avant propos</b>	<b>p. 1</b>
<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>p. 2</b>
<b>2. EXAMEN BIBLIOMETRIQUE DE LA RECHERCHE MONDIALE CONSACREE AUX PROTEAGINEUX</b>	<b>p. 8</b>
LE POIDS DE LA RECHERCHE SUR LES PROTEAGINEUX	p. 9
L'EFFORT DE RECHERCHE DANS LES DIFFERENTES DISCIPLINES	p. 11
LES INTERACTIONS ENTRE DISCIPLINES	p. 13
LA POSITION DE LA FRANCE DANS LE CONTEXTE EUROPEEN ET MONDIAL	p. 13
<b>3. LA PLANTE ENTIERE</b>	<b>p. 16</b>
<b>3.1 Biologie de la germination</b>	<b>p. 17</b>
GERMINATION ET DORMANCE DES GRAINES	p. 17
LA LONGEVITE DES GRAINES	p. 19
<b>3.2 Fonctionnement de la plante et peuplement</b>	<b>p. 21</b>
PHENOLOGIE	p. 21
ARCHITECTURE	p. 23
ACQUISITION DES RESSOURCES CARBONEES ET NUTRITION AZOTEE	p. 26
REPARTITION DES FLUX DE CARBONE ET D'AZOTE	p. 30
STRESS ABIOTIQUES	p. 32
CONCLUSION SUR L'ELABORATION DU RENDEMENT	p. 36
<b>3.3 Les contraintes biotiques (parasiteurs et ravageurs)</b>	<b>p. 38</b>
IDENTIFICATION DES BIOAGRESSEURS ET ETIOLOGIE DES MALADIES	p. 38
POPULATION DES BIOAGRESSEURS ET GESTION DES RESISTANCES	p. 41
GENETIQUE DES RESISTANCES PARTIELLES	p. 43
EPIDEMIOLOGIE ET NUISIBILITE DES BIOAGRESSEURS	p. 47
<b>3.4 Les apports de la génomique</b>	<b>p. 51</b>

<b>4. QUALITE ET UTILISATION</b>	<b>p. 57</b>
<b>4.1 Elaboration de la graine et composition</b>	<b>p. 58</b>
LE DEVELOPPEMENT DE LA GRAINE	p. 58
DETERMINISME DE LA TENEUR EN PROTEINES	p. 59
DETERMINISME DE LA COMPOSITION DES RESERVES PROTEIQUES	p. 60
DETERMINISME DE LA COMPOSITION DES RESERVES AMYLACEES	p. 61
POLYSACCHARIDES PARIETAUX ET $\alpha$ -GALACTOSIDES	p. 62
<b>4.2 Semences et qualité germinative de la graine</b>	<b>p. 68</b>
ELABORATION DE LA QUALITE SUR LE PORTE – GRAINES	p. 68
TECHNOLOGIE DES SEMENCES	p. 69
MESURE DE LA QUALITE GERMINATIVE	p. 70
<b>4.3 Propriétés nutritionnelles et Utilisation en alimentation animale</b>	<b>p. 72</b>
LA VALEUR ENERGETIQUE CHEZ LE PORC, LA VOLAILLE, LES RUMINANTS	p. 74
LA VALEUR PROTEIQUE CHEZ LE PORC, LA VOLAILLE, LES RUMINANTS	p. 77
LA VALEUR SANITAIRE	p. 81
<b>4.4 Propriétés fonctionnelles et utilisation :</b>	
<b>Alimentation humaine et application non-alimentaires</b>	<b>p. 88</b>
UTILISATION DE LA GRAINE EN ALIMENTATION HUMAINE COMME LEGUME SEC	p. 88
VALORISATION INDUSTRIELLE DES CONSTITUANTS BIOCHIMIQUES DE LA GRAINE	p. 89
<b>5. CONCLUSION</b>	<b>p. 96</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>p. 102</b>
Les fiches détaillées des recherches effectuées et des moyens affectés dans les départements INRA sur la période 1995-1999.	

## Avant Propos

L'état de la recherche sur les protéagineux a pour objectif de proposer un bilan des activités de recherches menées par discipline et pour différentes espèces. Cependant afin de mieux mettre en évidence la nécessaire complémentarité entre les disciplines, le plan adopté pour le rapport d'état de la recherche est transdisciplinaire et reprend les différentes étapes de la filière qui concernent directement l'INRA, de la semence à la transformation. *Au sein de chaque chapitre, à partir d'un plan identique, plusieurs niveaux de lectures sont possibles :*

- les paragraphes introductif et conclusif, respectivement « Enjeux » et « Commentaires et perspectives », permettent d'avoir une vision synthétique de l'état de la recherche nationale et de son insertion dans le tissu international ;
- les paragraphes « Résultats acquis » et « Recherche en cours » concernent principalement la recherche nationale, resituée par rapport à la recherche internationale. Ces paragraphes ne prétendent pas l'exhaustivité : en particulier les domaines de recherches couverts par l'INRA ont quelquefois été abordés prioritairement. Certains domaines peuvent être traités plus succinctement.

*Un bilan exhaustif des travaux opérationnels effectués par les équipes INRA dans la période 1995-1999* est proposé en annexe sous forme de fiches. Outre la présentation des travaux et des moyens disponibles, tant humains que financiers, les références des principales publications sont indiquées.

# 1. INTRODUCTION

## Introduction générale

*Le terme de "protéagineux" entendu au sens étymologique (plante ou graine qui contient des protéines à un taux "important") est a priori ambiguë puisqu'il peut englober un grand nombre de végétaux et de familles de végétaux qui sont très différents dans leurs compositions, leurs familles botaniques, leurs modes et zones de culture, leurs formes d'utilisation (en alimentation humaine ou animale, ou bien en industrie, en l'état ou après des transformations par diverses technologies) et leurs organisations de marchés sur les plans réglementaire, économique et commercial.*

*Globalement on est amené à distinguer 3 familles de produits<sup>1</sup> : (a) les protéagineux stricto-sensu au sens de la réglementation communautaire<sup>2</sup> (pois, féverole, lupin), (b) les "autres légumineuses à graines" au sens de la réglementation communautaire<sup>3</sup> (pois chiche, lentille et vesces), et enfin (c) le soja, pourtant plus généralement considéré comme un "oléagineux" ou un "oléoprotéagineux", qui était régi par l'Organisation Commune de Marché (OCM) "matières grasses" au même titre que le colza ou le tournesol. Le soja diffère très fortement des autres "protéagineux" qui sont le plus souvent utilisés en l'état, en raison de son passage très généralisé par une étape de trituration. Par ailleurs une partie importante de la valorisation de cette graine est assurée par l'huile qui représente environ 17 % en poids et beaucoup plus en valeur, mais ce pourcentage variant très fortement selon la conjoncture des prix mondiaux des matières riches en protéines (MRP) et des matières grasses (MG).*

Au niveau mondial, *les légumineuses à grosses graines* (familles (a) et (b)) *représentent* une culture extrêmement importante avec *une superficie estimée par la FAO à 67 millions d'hectares contre 71 millions pour le soja* et, à titre de comparaison, 224 pour le blé et 308 pour les céréales fourragères (surtout maïs et orge). La production des légumineuses qui ont en général (à l'exception de l'UE) des rendements faibles atteint seulement 56 millions de tonnes alors que celle de soja est de 158 millions.

Les protéagineux sont avant tout cultivés dans des pays en développement (notamment en Inde et en Chine), pour satisfaire les besoins alimentaires intérieurs de leur population. Le Canada, l'Australie et plus récemment l'Ukraine et certains PECOS qui s'intéressent à l'exportation constituent de relatives exceptions et le commerce mondial reste limité. Pour le soja au contraire, une grande partie de la production qui est localisée en Amérique du Nord (États-Unis) et du Sud (Brésil, Argentine) est destinée à l'exportation sous les trois formes de graines, de tourteaux et d'huiles (Figure.1).

Sur le marché international des "protéagineux", l'UE et la France occupent une position particulière pour différentes raisons. Tout d'abord la production de soja est très faible (environ 1,3 millions de tonnes) par rapport à celle des protéagineux (6,0 millions de tonnes) en raison principalement des différences dans des réglementations communautaires qui influent fortement sur la compétitivité de ces divers produits. Ensuite, à l'intérieur des protéagineux, l'essentiel de la production est constitué par les pois et féveroles – ces deux cultures étant pour la presque totalité destinées à l'alimentation animale – alors que les productions des autres légumineuses surtout destinées à l'alimentation humaines (lentilles, pois chiche, haricots secs) restent faibles. *Globalement, dans l'UE tous les secteurs qui intéressent les protéagineux*

<sup>1</sup> Les "légumineuses à petites graines" (essentiellement la luzerne) qui font l'objet d'une Organisation Commune de Marché (OCM) lorsqu'elles sont déshydratées, sont analysées par le groupe "dynamique filière : fourrages"

<sup>2</sup> En particulier du règlement 1765/92.

<sup>3</sup> En particulier du règlement 1577/96

(graines pour l'alimentation humaine ou animale, graines pour la trituration) sont très largement déficitaires (Figure 2).

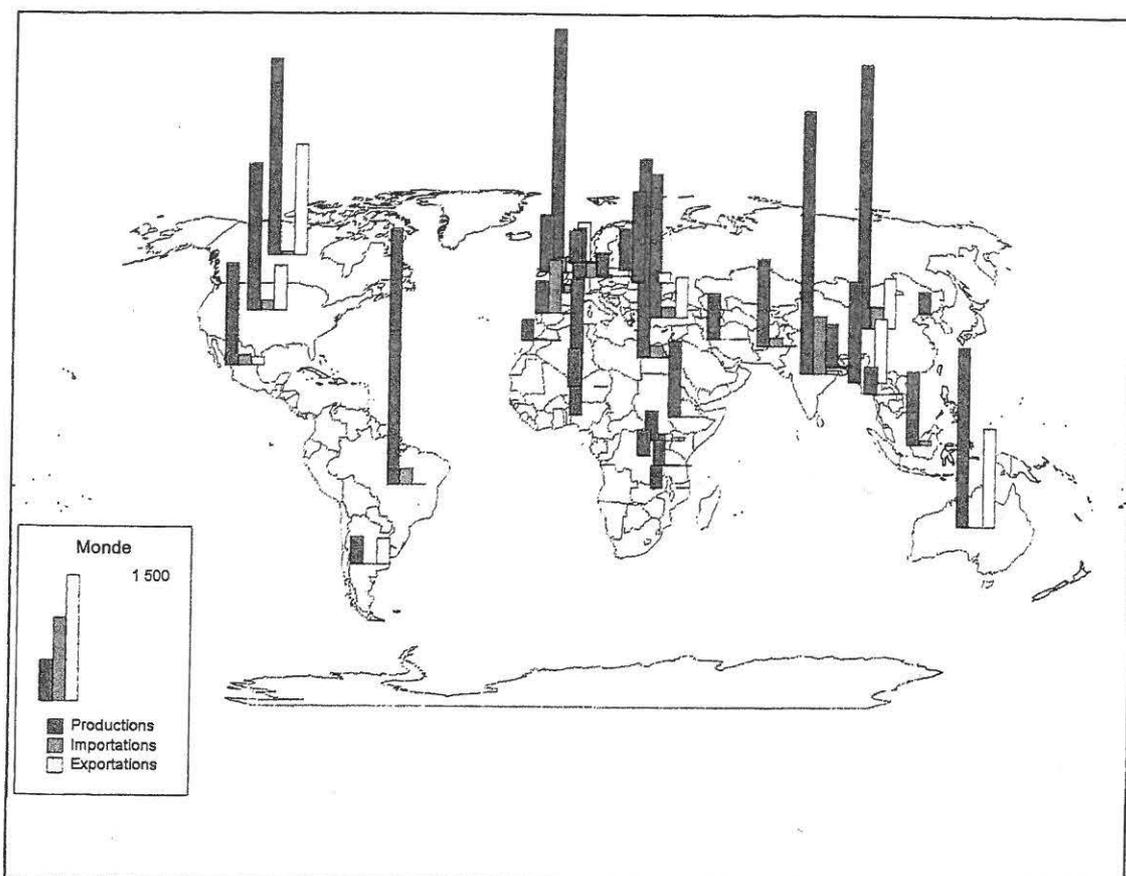


Figure 1 : Production et commerce extérieur des principaux pays producteurs en légumineuses

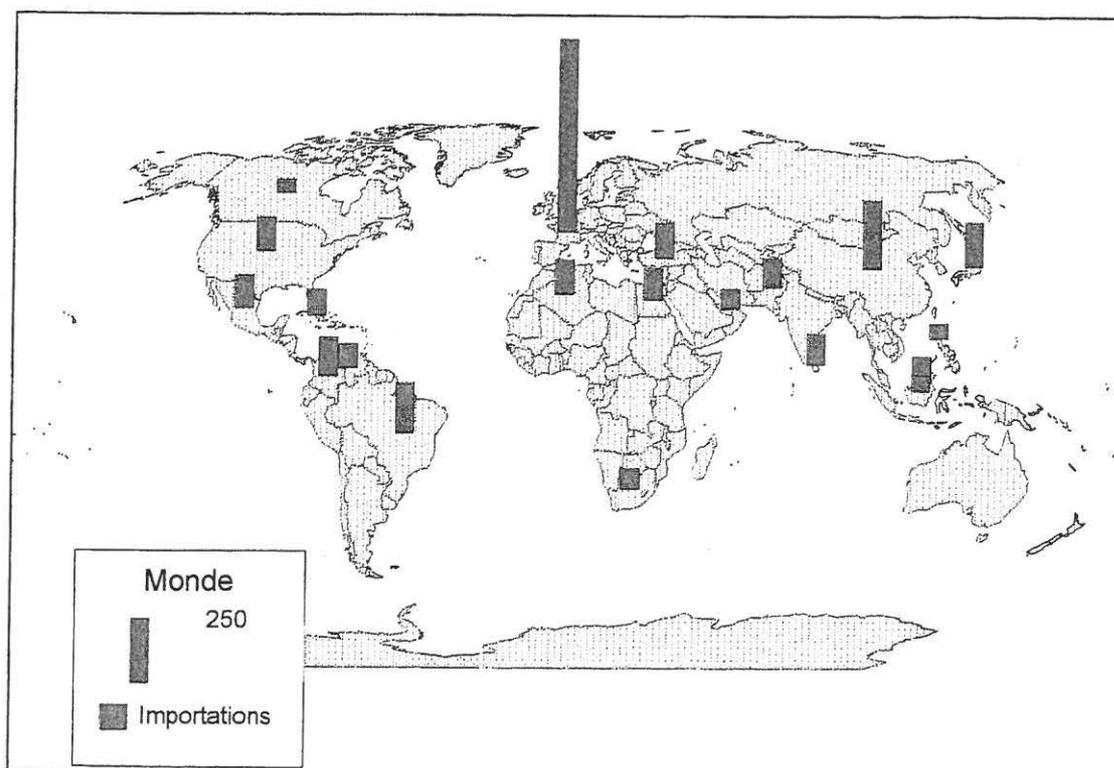


Figure 2 : Importations des principaux pays importateurs en légumineuses (global UE)

Après un développement très important jusqu'à la mise en place de la première réforme de la Politique Agricole Commune (PAC) en 1993, le marché communautaire des protéagineux a eu ensuite tendance à stagner. Il est à nouveau confronté à un certain nombre de problèmes et d'incertitudes liés en particulier à la mise en place de l'Agenda 2000 et à l'évolution de certains cours mondiaux comme ceux du tourteau de soja. Depuis la disparition en juillet 1992 des aides versées aux utilisateurs (essentiellement les fabricants d'aliments composés) au moment de l'incorporation de ces graines, *les prix du marché intérieur se déterminent presque uniquement en fonction des prix des principaux produits substituables : essentiellement les céréales (et surtout le blé) et le tourteau de soja.*

Alors que ce premier prix reste fortement lié au prix d'intervention des céréales, déterminé par l'UE et sensiblement supérieur aux cours mondiaux, le second est directement lié aux cours mondiaux puisque ces produits peuvent entrer dans l'UE sans aucun droit de douane ou limite quantitative. Les prix intérieurs des protéagineux subissent également la pression des arrivages de ces produits, sans pratiquement aucune protection, en provenance de l'Australie, du Canada et de l'Ukraine. Pour tous ces pays, l'UE constitue un débouché intéressant tant que le niveau plus élevé des prix des céréales sur ce marché leur permet de vendre, à qualité égale et pour le débouché en alimentation animale, à des prix plus élevés que dans les autres pays où s'appliquent directement les cours mondiaux des céréales.

*Durant les dernières années, le principal frein à l'utilisation des protéagineux (et surtout des pois) en alimentation animale a été le faible niveau de la production comme le montre l'existence d'un certain courant d'importation.* Pour l'agriculteur, sur un plan strictement économique, pour que cette culture soit compétitive, il faut que la marge brute escomptable pour cette culture soit égale ou supérieure à celle des principales cultures concurrentes (souvent le blé tendre). Cela implique en première approximation que le revenu par hectare (prix de marché anticipé multiplié par le rendement escompté augmenté de l'aide fixe à l'hectare) soit supérieur à celui des céréales. Compte tenu de la programmation d'une sensible baisse du différentiel des aides à l'hectare entre les protéagineux et les céréales, *c'est donc d'abord sur les aspects de rendement (en particulier par rapport aux céréales) et de prix (directement liés à l'évolution de la composition et de la valeur nutritionnelle) que se jouera l'avenir de cette production dans l'UE. Par ailleurs, compte tenu des préoccupations croissantes en terme de durabilité de l'agriculture et de respect de l'environnement, les protéagineux peuvent présenter de nombreux avantages et limiter les risques environnementaux liés à un manque de diversité des cultures.*

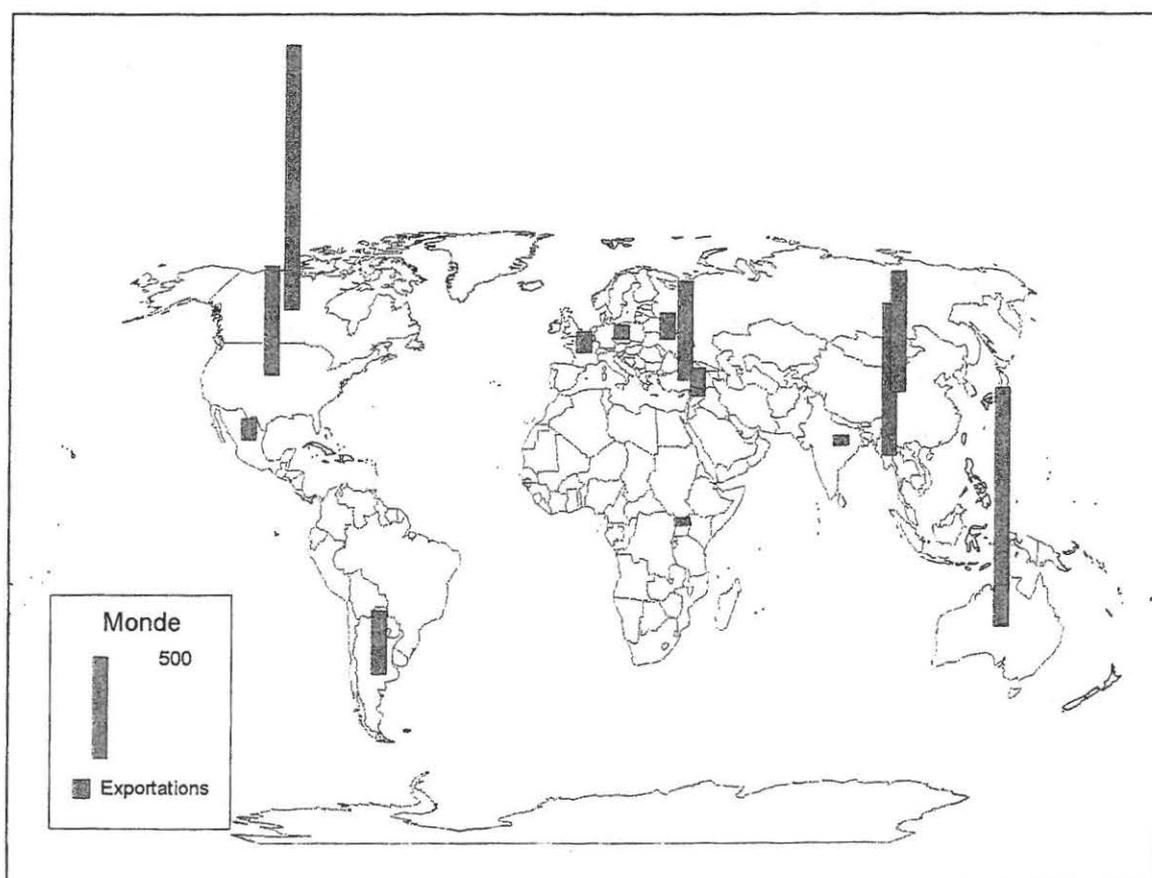
En terme de rendement, le niveau relatif du pois par rapport au blé qui s'est maintenu à une moyenne nationale d'environ 80 % depuis une quinzaine d'années doit donc se maintenir, voire s'améliorer au cours des prochaines années. *Cela implique que les progrès génétiques soient équivalents ou supérieurs à ceux obtenus sur le blé.*

En terme de prix, le niveau doit être suffisamment élevé pour permettre à l'agriculteur d'obtenir une marge suffisante, mais pas trop élevé pour que, au niveau du fabricant d'aliment composé, cette matière première reste compétitive par rapport aux céréales largement disponibles sur la marché communautaire et aux divers produits d'importation (en particulier le tourteau de soja, mais aussi des pois et des lupins). Dans une conjoncture donnée, c'est donc *en améliorant la valeur alimentaire pour les animaux* de ce produit, qu'une meilleure valorisation peut être obtenue. Les aliments pour porcs constituent actuellement le principal débouché. L'augmentation du différentiel de prix par rapport au blé et le rapprochement du prix par rapport au tourteau de soja passe par une augmentation de la teneur de ce produit en énergie et

en certains acides aminés indispensables. L'élargissement des débouchés de ce produit dans les aliments pour volailles, qui permettrait un gain notable du prix d'intérêt et donc du prix de marché passe également par l'augmentation de la concentration en énergie et/ou protéines de ces graines. Enfin les aliments pour bovins produits, industriellement ou dans les exploitations agricoles pourraient fournir des débouchés complémentaires.

Malgré certains problèmes conjoncturels rencontrés notamment au cours de l'année 1999 où le prix du tourteau de soja avait été très bas, les protéagineux produits en France et dans l'UE bénéficient d'un potentiel de croissance en alimentation animale très important qui tient notamment à *la situation de très fort déficit de l'UE en MRP* et aux perspectives d'augmentation du différentiel de prix entre les céréales communautaires et le tourteau de soja avec la mise en place de l'Agenda 2000.

Les utilisations des pois et fèves en alimentation humaine, soit en l'état soit après une transformation industrielle (production de farine, extraction des protéines ou de l'amidon) représentent actuellement un très faible tonnage en France et dans l'UE et concernent très peu d'industriels. Compte tenu des propriétés nutritionnelles et fonctionnelles spécifiques des protéagineux, ce débouché pourrait s'accroître de façon importante à condition d'une plus forte implication de partenaires industriels et d'une meilleure compétitivité par rapport aux produits dominants sur ces créneaux que sont les protéines de soja et de blé, ainsi que les protéines laitières. *Comme pour le soja, il existe également des possibilités de développement des utilisations de produits issus des protéagineux dans les domaines non alimentaires.*



*A l'exportation l'UE pourrait augmenter ses fournitures vers certains pays en développement comme l'Inde ou le Pakistan, où la demande intérieure pour l'alimentation humaine, stimulée par un fort accroissement démographique, progresse plus rapidement que la production locale. Pour satisfaire cette demande spécifique, l'UE doit disposer de graines adaptées à ces usages et être compétitive sur ces marchés par rapport aux principaux fournisseurs que sont aujourd'hui l'Australie, le Canada et les Etats-Unis (Figure 3).*

***Sur la base de cette analyse économique succincte, on peut donc identifier les principaux verrous au développement des protéagineux en Europe :***

- ✓ Un différentiel de rendement trop faible par rapport au blé malgré des gains de productivité importants du pois au cours des vingt dernières années (1,3 % par an en moyenne) ;
- ✓ Un marché trop étroit, principalement limité à l'alimentation animale et plus particulièrement du porc ;
- ✓ Une forte concurrence du soja comme source de protéines et des céréales comme source d'énergie ;
- ✓ Une production principalement limitée à la France, malgré des contextes agronomiques intéressants dans d'autres pays (U.K, Allemagne).

***Les leviers de la compétitivité pour les protéagineux en Europe sont donc les suivants :***

- ✓ Réduire les coûts de production par un accroissement du rendement et/ou une réduction des charges (mécanisation, intrants) ;
- ✓ Améliorer la valeur alimentaire de la graine (accroître la teneur en protéines, la digestibilité des protéines et de l'énergie, améliorer le profil en acides aminés) et réduire sa variabilité ;
- ✓ Valoriser les atouts des protéagineux par rapport aux autres productions, tant du point de vue agronomique (place dans la rotation des cultures, plante économe en eau, en intrants) que de l'utilisation ;
- ✓ Elargir les domaines d'utilisation vers d'autres créneaux en alimentation animale (en particulier volailles) mais aussi vers des usages en alimentation humaine, notamment sur les marchés à l'exportation sous forme de graines, ou à travers le développement d'une filière de transformation.

*A travers un examen des thématiques développées au sein des différents champs disciplinaires, ce document a pour objectif d'examiner comment la recherche a su prendre en compte ces enjeux.*

*Une étude bibliométrique introductive permet de dresser le bilan général des recherches effectuées sur les trois grandes familles de plantes que nous avons considérées : les protéagineux stricto sensu (pois, féverole, lupin), les légumineuses à graines destinées principalement à l'alimentation humaine (légumes secs : haricot, lentille, pois chiche...) et le soja, incontournable comme référence pour les travaux en agronomie et sur les protéines. Nous avons également inclus dans cette étude le recensement des occurrences sur les plantes modèles (*Arabidopsis*, *Medicago* et *Lotus*), pour leur intérêt prospectif.*

*L'état de la recherche, à travers les thématiques, de la plante à la graine et aux produits transformés, a été focalisé principalement sur le pois (*Pisum sativum* L.), compte tenu du développement économique de cette plante en Europe et en France, sans pour autant exclure les autres espèces quand les travaux y afférant présentent un intérêt scientifique marqué pour l'ensemble de la problématique.*

## **2. EXAMEN BIBLIOMETRIQUE DE LA RECHERCHE MONDIALE CONSACREE AUX PROTEAGINEUX**

*Les forces de recherche sur les protéagineux au niveau international, la place des différents champs disciplinaires et le poids des blocs géopolitiques dans ces recherches ont été évalués de manière globale à travers une étude bibliométrique effectuée dans la période 1990-1999.* La base CAB Abstracts a été retenue pour cette étude pour sa large couverture thématique dans le domaine considéré et l'existence de champs d'indexation (cubicodes) assez bien adaptés aux objectifs de l'étude. Parmi ceux-ci, nous avons sélectionné pour notre étude l'agronomie, la biologie et la physiologie végétale, la biotechnologie, la génétique, la pathologie, l'alimentation humaine, l'alimentation animale et l'économie. Seuls les documents à caractère scientifique (articles originaux dans les revues internationales et actes de congrès) ont été pris en compte.

*Dix plantes ont été retenues pour ces travaux :*

- ✓ *Les plantes de grandes cultures* cultivées principalement pour une filière industrielle de valorisation :  
Soja, Pois, Féverole, Lupin
- ✓ *Les légumes secs* destinés à l'alimentation humaine :  
Lentille, Haricot, Pois chiche
- ✓ *Les plantes modèles* d'intérêt scientifique pour les protéagineux :  
*Arabidopsis thaliana, Medicago truncatula, Lotus corniculatus et japonicus.*

## LE POIDS DE LA RECHERCHE SUR LES PROTEAGINEUX

*Sur la période 90-99, on totalise 52422 documents* dont 47458 articles de journaux consacrés aux dix plantes considérées. De l'ordre de 80 % des documents sont rédigés en langue anglaise (3,5% en Chinois, 1% en Français).

*L'effort de recherche sur les protéagineux semble relativement constant sur les dix dernières années* (5200 références par an) et représente de l'ordre de 3,45 % des travaux référencés dans la base CAB. Que l'on considère les plantes de grande culture ou les légumes secs, on observe une très grande stabilité du nombre de références entre 90 et 98. Le fait le plus marquant est la croissance régulière sur cette période du nombre de références concernant *Arabidopsis thaliana* (1990 : 142 références, 1998 : 945 références).

On note la *forte prédominance des recherches sur le soja* (environ 39% des recherches mondiales sur les protéagineux), mais aussi la part significative occupée par les travaux sur le pois et le haricot et sur *Arabidopsis* (Figure 4) L'effort de recherche sur *Lotus* et *Medicago* est stable (120 références par an) mais reste faible. A l'exception du haricot, on observe également peu de travaux consacrés aux légumes secs (lentille, pois chiche).

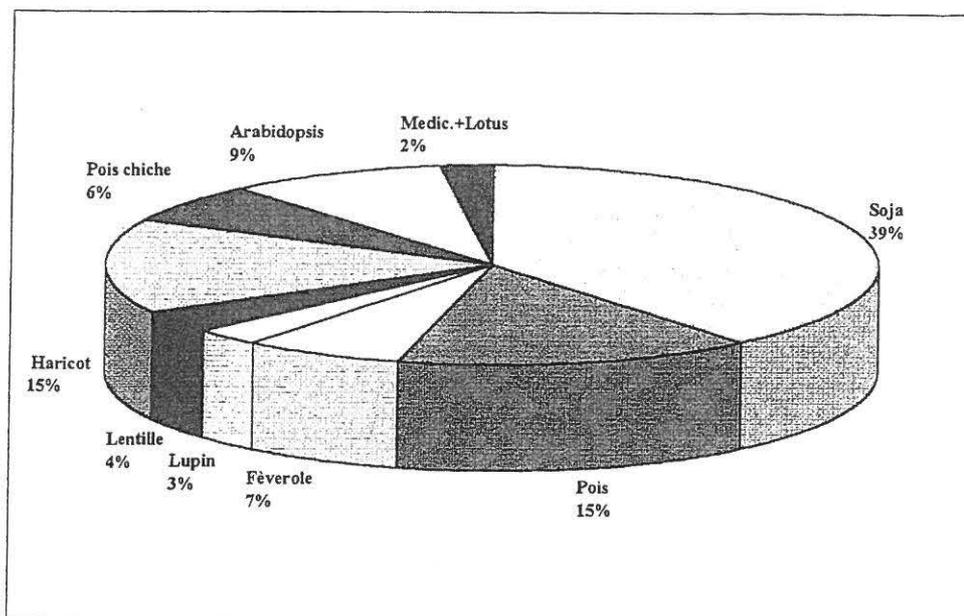


Figure 4 : Poids relatif des recherches mondiales par espèce

*La contribution des différentes régions du globe (Figure 5) à ces recherches est assez contrastée.*

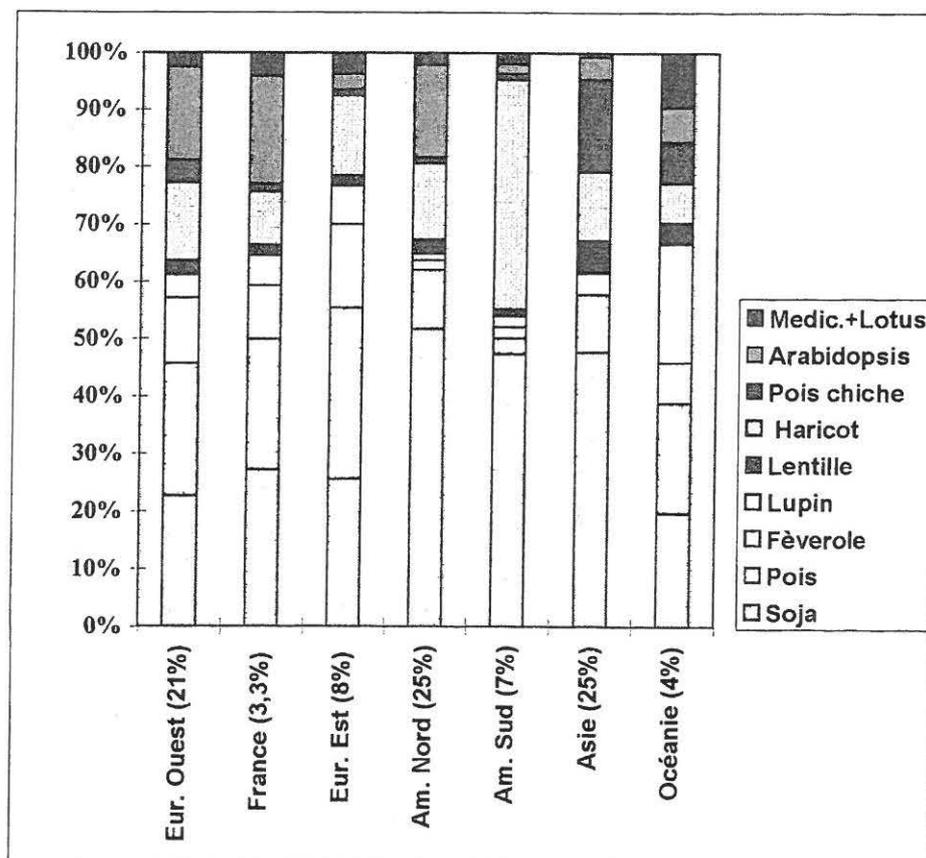


Figure 5: Contribution des blocs géographiques aux recherches sur les protéagineux.

\* Les valeurs entre parenthèses représentent la contribution de chaque bloc aux références globales sur les protéagineux répertoriées dans la base CAB.

*Même si les efforts de recherche de l'Amérique du Nord (25 %), de l'Europe de l'Ouest (21 %) et de l'Asie (25 %) sont quantitativement assez comparables et très largement supérieurs à ceux des autres parties du monde (4 à 8 %), les espèces d'intérêt sont différentes dans ces pays.*

➤ Au plan mondial, les recherches sur le soja sont présentes dans tous les pays avec une nette prédominance en Amérique Nord et Sud et en Asie. Cependant, la contribution de l'Europe à ces travaux est significative et reflète principalement les nombreuses études sur l'utilisation du soja en alimentation animale.

➤ *Les travaux sur le pois* sont essentiellement localisés en Europe et en Océanie, tandis que ceux relatifs au haricot sont menés dans la zone Amérique centrale et du Sud, qui y consacre 40 % de son effort de recherche "protéagineux".

➤ La lentille représente près de 10 % des recherches de la zone "Bassin méditerranéen" et le pois chiche plus de 16 % de la zone asiatique. Ces deux plantes ont des poids très faibles dans l'ensemble des autres zones.

On retrouve donc très naturellement dans cette répartition géographique des recherches l'influence des politiques agricoles des pays.

➤ *Les travaux sur les plantes modèles* sont exclusivement menés par les pays les plus développés et focalisés sur *Arabidopsis thaliana* en Europe de l'Ouest et en Amérique du Nord, sur *Lotus* en Océanie. On note assez peu d'intérêt jusqu'à présent pour *Medicago*.

## L'EFFORT DE RECHERCHE DANS LES DIFFERENTES DISCIPLINES

Pour les dix plantes considérées, la représentation des différentes disciplines dans la base CAB met en évidence *un nombre d'occurrences beaucoup plus important en agronomie, génétique, physiologie et pathologie que dans les autres disciplines* (Figure 6).

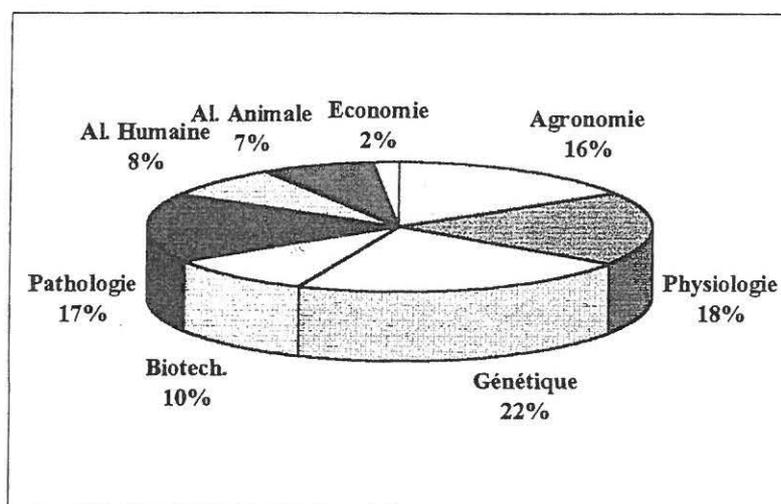


Figure 6 : Poids respectif des différentes disciplines dans les recherches sur les protéagineux.

*Ce nombre est à l'inverse proportionnellement assez faible pour le secteur "transformation" - économie, alimentation humaine, alimentation animale -.* Nous n'avons pu identifier à ce stade s'il s'agit d'une caractéristique de la base de données CAB, plus orientée vers les disciplines liées à la production agricole, ou si l'activité de recherche

consacrée à la transformation se caractérise par un volume de publications plus faible. Notons en particulier que la base CAB ne rend pas bien compte des brevets.

L'analyse des occurrences annuelles pour chaque discipline entre 1990 et 1998 montre *une extrême régularité des publications pour toutes ces disciplines, traduisant un effort soutenu et constant de recherche dans le domaine*, avec toutefois une exception dans le cas de la génétique et de la biotechnologie en progression régulière depuis 1993. L'analyse plus fine de cette évolution montre un recouvrement important entre ces deux disciplines et traduit qu'au cours des dernières années la progression des publications en génétique résulte exclusivement du développement des biotechnologies (1990 : 520 références, 1998 : 986 références). Notons d'ailleurs que cet accroissement est modéré (50 références/an), à cause très probablement de difficultés à transformer ces plantes, y compris le soja.

Cette répartition disciplinaire de l'effort de recherche est assez générale quelles que soient les espèces considérées. Il existe toutefois quelques singularités :

- ✓ Un effort plus important sur le soja en alimentation humaine et en alimentation animale (14 % des références soja pour chacune des disciplines) ;
- ✓ La prédominance de la physiologie (26 % des références) et l'effort significatif en biotechnologie (9 %) dans le cas du pois ;
- ✓ Un effort focalisé sur la génétique (37 %), la physiologie (22,5 %) et la biotechnologie (28,7 %) dans le cas d'*Arabidospis*, excluant la pathologie, l'agronomie et les sciences de la transformation.

*L'effort des blocs géographiques dans ces différents champs disciplinaires est variable.* La suprématie scientifique de l'Amérique du Nord en génétique, biotechnologie et pathologie, toutes espèces confondues, est évidente (Tableau 1). *L'Amérique du Nord* occupe une place prépondérante pour ces quatre disciplines avec 40 % des occurrences en biotechnologie, devant l'Europe (33,5 %). *L'Europe de l'Ouest* moins compétitive dans ces domaines soutient la comparaison en agronomie et dans le secteur de la transformation avec une position dominante en alimentation animale. Par contre, elle présente pour cette filière de production une situation particulièrement faible en économie.

DISCIPLINE	Eur. Ouest	dont Franc e	Eur. Est	Am. Nord	Am. Sud	Bass. Med	Asie	dont Chine	Océani e	Autre s Pays	Total (%)
Economie	11,5	1,4	3,3	22,6	8,1	1,2	30,9	1,80%	2,3	20,0	100
Agronomie	20,7	3,6	9,7	22,4	6,3	4,3	26,6	4,41%	5,1	4,8	100
Physiologie	27,5	4,2	7,9	28,7	4,2	3,0	20,7	4,13%	4,6	3,3	100
Biotechnol	33,5	5,8	3,4	40,5	2,1	1,2	13,9	2,14%	3,3	2,1	100
Génétique	22,8	3,7	6,2	31,5	5,3	1,9	23,8	5,2%	3,5	4,8	100
Pathologie	17,8	2,1	6,6	27,0	8,2	3,9	25,9	3,55%	3,4	7,1	100
Al. Humaine.	22,5	3,1	6,4	22,1	7,3	3,1	26,3	2,01%	2,4	10,0	100
Al. Animale	26,4	5,1	10,7	23,4	6,4	3,2	16,8	1,43%	4,9	8,1	100

Tableau 1 : Contribution relative (%) des différents blocs géographiques aux différentes recherches sur les protéagineux par disciplines

Comme l'Europe et l'Amérique du nord, *l'Asie* génère aussi environ 25 à 30 % de l'activité de recherche dans ces champs disciplinaires, avec des positions particulièrement fortes en économie, agronomie et alimentation humaine et faible en biotechnologie. La Chine se place bien en génétique où elle représente plus de 5 % de l'effort mondial de recherche, et 4,4 % en agronomie.

## LES INTERACTIONS ENTRE DISCIPLINES

*Les interactions entre disciplines ont été analysées à partir de leur taux de recouvrement, c'est-à-dire du nombre d'occurrences communes à deux champs disciplinaires.*

➤ Les disciplines qui paraissent les plus en relation sont la génétique et la biotechnologie comme nous l'avons déjà mentionné. Selon les espèces, le taux d'intégration de la biotechnologie à la génétique est de l'ordre de 80 à 85 % pour les plantes de grande culture, 43,5 à 70 % pour les légumes secs et de 87 à 96 % pour les plantes modèles. Sur les plantes de grande culture, et plus encore sur les plantes modèles, l'essentiel de l'effort de recherche dans le domaine de la génétique s'appuie donc de plus en plus sur des approches biotechnologiques.

Par contre les liens entre la génétique et l'agronomie, la pathologie et la physiologie sont dans l'ensemble relativement faibles. Les taux de recouvrement des occurrences entre ces disciplines sont compris entre 11 et 25 % selon les espèces.

De manière plus générale on observe que :

➤ La physiologie est surtout en interaction avec l'agronomie ; pour huit des dix plantes étudiées le taux de recouvrement est supérieur à 30 % et atteint 40 % dans certains cas (soja, féverole, lupin, haricot). Par contre ces interactions sont faibles dans le cas des espèces étudiées dans les pays en voie de développement (inférieur à 20 % pour la lentille et le pois chiche). Pour ces espèces, la littérature réserve une large part aux travaux concernant la conduite des cultures. Les interactions physiologie/génétique et physiologie/biotechnologie existent peu dans le cas des plantes de grande culture mais deviennent perceptibles pour les plantes modèles ;

➤ L'agronomie, assez fortement liée à la physiologie et à la génétique développe peu d'interactions avec la pathologie et la biotechnologie ;

➤ La pathologie apparaît comme une discipline assez isolée avec peu d'interactions que ce soit avec la génétique, l'agronomie, la physiologie ou les biotechnologies. Ces interactions semblent toutefois se développer dans le cas des études sur *Arabidopsis*, en particulier avec la génétique et la biotechnologie ;

➤ La biotechnologie est identifiée comme une discipline dont les objectifs concernent surtout la génétique et la physiologie ;

➤ Le recouvrement entre alimentation humaine et alimentation animale est important pour le soja (45 %), le lupin (51 %), moindre pour le pois (14 %) et la féverole (26 %). Des liens existent entre ces disciplines et l'agronomie, mais de manière surprenante assez peu avec la génétique.

## LA POSITION DE LA FRANCE DANS LE CONTEXTE EUROPEEN ET MONDIAL

*La contribution de la France aux recherches mondiales sur les protéagineux est quantitativement de l'ordre de 3,3 %, soit environ 15,5 % des recherches européennes.*

Le profil de ces recherches par espèce est assez voisin de celui de l'ensemble de l'Europe de l'Ouest avec cependant un effort plus important sur le pois (5,1 % et 15,2 % des recherches mondiales et européennes respectivement) et le soja (2,3 % et 18,6 % des recherches mondiales et européennes) qui à eux-seuls représentent dans ce domaine 50 % des efforts de recherche de la France (Figure 5).

L'autre volet majeur des recherches concerne les plantes modèles, *Arabidopsis* et *Medicago*. Sur ces espèces, l'effort relatif de la recherche française est sensiblement plus important que

celui de la plupart des pays, au plan européen et mondial. Environ 6,5 % et 16 % des références au plan mondial sur *Arabidopsis* et *Medicago* respectivement sont effectuées par des laboratoires français. On peut souligner la position dominante de la France en Europe sur ces plantes (25 % et 64 % de l'effort européen sur *Arabidopsis* et *Medicago* respectivement). On observe en revanche un certain déficit de recherche sur les légumes secs, et en particulier sur le haricot.

*Le profil disciplinaire des activités de recherche sur les protéagineux en France* se différencie assez peu de celui de l'Europe de l'Ouest (Figure 7). Comparée à celle de l'Amérique du Nord, cette activité se caractérise par des efforts un peu plus importants en agronomie, et surtout en alimentation animale, plus faible en pathologie.

*Si l'on considère le pois*, la répartition disciplinaire de l'activité de recherche se différencie assez peu en France de celle de l'Europe de l'Ouest. L'effort significativement plus élevé effectué par l'Amérique du Nord en biotechnologie est aussi perceptible sur cette espèce. On note par contre l'absence de recherche en alimentation animale dans ces pays.

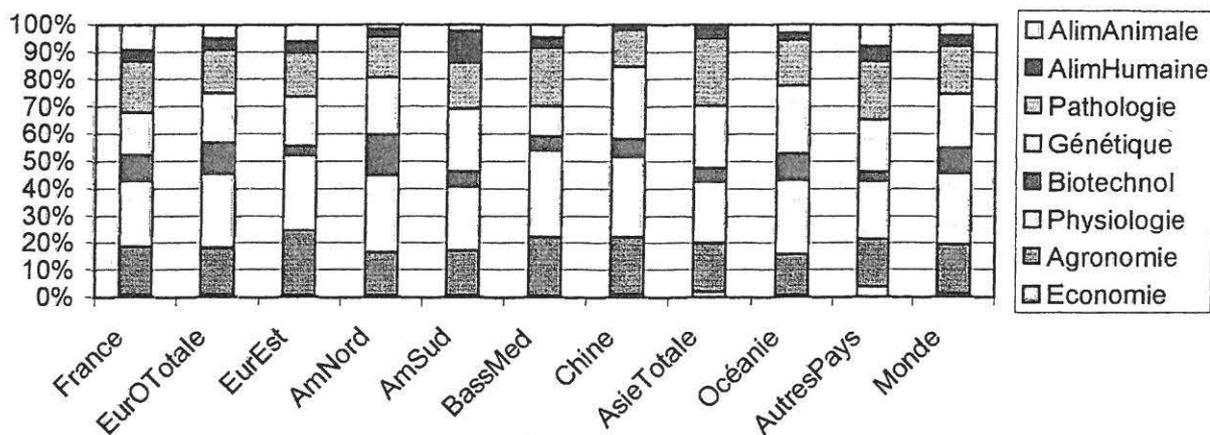


Figure 7 : Importance relative des différentes disciplines dans les recherches effectuées sur le pois dans les différents pays

*Considérant que la contribution moyenne de la France aux occurrences sur les protéagineux au plan mondial est de 3,3 %, elle apparaît en position plus forte en physiologie (4,2 %), biotechnologie (5,8 %) et alimentation animale (5,1 %), moyenne en agronomie, génétique et alimentation humaine, nettement plus faible en pathologie (2,1 %) et économie (1,4 %).*

## CONCLUSION

### *Cette étude fait ressortir les points suivants :*

- Sur la décennie considérée 90-99, l'effort de recherche global dans le secteur des protéagineux paraît très stable sur les plantes de grandes culture (soja, pois, haricot et féverole) et les légumes secs (lentille, haricot, pois-chiche) ;
- On constate une évolution significative du nombre de travaux consacrés aux plantes modèles (essentiellement *Arabidopsis*) ;
- Pour la plupart des thématiques, on constate l'extrême régularité des publications, sauf dans le cas de la biotechnologie en régulière progression ;
- L'essentiel de l'effort de recherche en génétique semble s'appuyer sur des approches biotechnologiques ;
- L'interaction entre physiologie et agronomie, bien qu'à des degrés divers selon les espèces apparaît également nettement ;
- Quelles que soient les disciplines, on note une évolution comparable de l'effort de recherche sur les plantes de grande culture et les légumes secs, avec une suprématie générale des travaux concernant le soja : toutes disciplines confondues, 40 % de l'effort de recherche mondial porte sur cette espèce et sa prédominance est particulièrement marquée en agronomie (36 %), économie (57 %), alimentation humaine (64 %) et alimentation animale (71 %). Le pois et le haricot apparaissent également comme des espèces importantes du secteur « Protéagineux » et représentent chacun environ 15 % de l'activité de recherche totale de ce secteur.
- On peut remarquer une assez grande différence des espèces étudiées selon les pays : le pois et le lupin sont des espèces étudiées principalement dans les pays développés alors que le pois chiche, la lentille et le haricot sont plus étudiés dans les pays en voie de développement.
- La France présente quant à elle un profil cohérent avec celui de la zone ouest européenne, avec une bonne représentation en biotechnologie (près de 6 % de l'activité mondiale) et en alimentation animale (5 %).

### **3. LA PLANTE ENTIERE**

### 3.1 Biologie de la germination

#### ◆ *Enjeux*

Dans un marché de plus en plus concurrentiel et mondialisé, *la commercialisation de semences de qualité est un facteur de compétitivité majeur pour les entreprises semencières*. Comment produire des lots homogènes et de qualité, telle est la principale demande des producteurs adressée aux chercheurs ; or la qualité d'une semence s'exprime par trois composantes : physique, sanitaire et physiologique.

En matière de *qualité physiologique*, la recherche s'oriente à la fois vers la connaissance des mécanismes biochimiques et moléculaires à l'origine de la germination mais également vers celle des mécanismes régulateurs de celle-ci et responsables de dormances.

Un second objectif concerne *le maintien de la biodiversité végétale*. Or la conservation des ressources génétiques sous forme de semences n'est possible que si la qualité germinative une fois acquise est préservée. C'est pourquoi la recherche s'intéresse également à *la longévité des graines* en étudiant à la fois les mécanismes de détérioration des graines et le rôle des conditions environnementales sur la conservation de la qualité physiologique.

### GERMINATION ET DORMANCE DES GRAINES

#### ◆ *Résultats acquis par la recherche*

La succession des événements physiologiques liés à la germination de graines mises en présence d'eau est décrite depuis longtemps. L'entrée d'eau dans la graine suit trois phases : une imbibition directement liée au faible potentiel hydrique de la graine ; une stabilisation de la prise d'eau coïncidant avec la reprise des activités métaboliques ; enfin, une nouvelle absorption d'eau liée à l'élongation radiculaire chez les graines non dormantes qui précède les stades ultérieurs de croissance et de divisions cellulaires. Ces différentes étapes dépendent en premier lieu de la présence d'eau, mais également d'autres facteurs environnementaux (température, lumière, oxygène, substrat...) ou de facteurs propres aux graines (perméabilité tégumentaire, teneur en eau, taille...). Les hormones intervenant dans la germination sont également connues : gibbérellines et acide abscissique essentiellement. La reprise du métabolisme est décrite au plan biochimique, en particulier pour la respiration et la mobilisation des réserves par les graines. Par contre, peu d'éléments sont disponibles au plan moléculaire ; ils permettraient d'une part, de comprendre la régulation de la germination, et d'autre part, d'articuler les observations physiologiques faites face à des conditions défavorables à la germination.

En ce qui concerne les graines dormantes, deux types de dormance sont reconnues même si le concept de dormance reste subjectif puisque l'on parle de dormance face à une non germination observée dans des conditions considérées comme étant favorables. La dormance d'origine embryonnaire concerne peu les protéagineux contrairement à la dormance d'origine tégumentaire liée à une imperméabilité des enveloppes de la graine. C'est souvent le cas chez les légumineuses lorsque leur teneur en eau est basse, on parle alors de graines dures.

#### ◆ *Recherches en cours*

Les collections de mutants d'*Arabidopsis thaliana* permettent de développer une approche moléculaire de la germination. C'est le cas au Japon où divers instituts s'intéressent à la photorégulation de la germination, avec des études sur la transduction du signal lumineux via les phytochromes et la biosynthèse des gibbérellines. La réponse à ces hormones fait également l'objet d'études au John Innes Centre de Norwich (Peng et al., 1999).

D'autres axes de recherche sont développés à l'interface entre le développement des graines (fin de maturation) et leur germination. Ils concernent les mécanismes moléculaires de la dormance chez *Arabidopsis thaliana* et le rôle de l'acide abscissique (ABA) dans la dormance de *Nicotiana plumbaginifolia* étudiés au laboratoire de biologie des semences (INRA/INA-PG, Versailles) à l'aide de mutants ABA déficients. Des travaux sur la transduction de signal en réponse à l'acide abscissique sont menés au CNRS de Gif-sur-Yvette (Leung et Giraudat, 1998). La régulation hormonale de la germination via l'acide abscissique est également étudiée aux Etats-Unis (Xiong et al., 1999), au Royaume Uni, au Japon (Nambara et al., 1998) et au Canada (Bonetta et McCourt, 1998).

La régulation du métabolisme énergétique (rôle des mitochondries, calmoduline, thiorédoxine, NAD Kinase) ainsi que le rôle des lipoxygénases et des systèmes anti-oxydants dans la germination des semences de pois sont étudiés au GIS (Groupe de recherche fondamentale sur la biologie des semences à Angers) et le métabolisme oxydatif chez *Medicago truncatula* au laboratoire de biologie végétale et microbiologie de l'UMR CNRS-Université de Nice.

Une recherche plus appliquée susceptible d'aboutir à l'obtention de marqueurs de la qualité porte sur les protéines impliquées en début de germination ou au cours du priming chez *Arabidopsis* ainsi que sur le rôle des protéines biotinylées dans la germination du pois (UMR CNRS-Aventis, Lyon), ou du Soja (Embrapa au Brésil, USDA-ARS en Floride). Les sucres font également l'objet d'études via le rôle du métabolisme oxydatif et des oligosaccharides dans la qualité physiologique des semences de Pois (Laboratoire de physiologie végétale appliquée, université Paris VI). Quant au CPRO-DLO (Wageningen, Pays-Bas), des tests de qualité germinative y sont mis au point sur *Arabidopsis* afin de « screener » les collections de mutants pour des caractères de germination ou d'aptitude au stockage. L'objectif, à terme, est d'isoler et de caractériser des gènes de qualité des semences.

#### ◆ **Références bibliographiques**

- ✓ Bonetta D. et McCourt P. (1998) – Genetic analysis of ABA signal transduction pathways. *Trends in Plant Science* 3 (6), 231-235.
- ✓ Leung J. et Giraudat J. (1998) – Abscisic acid signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49, 199-222.
- ✓ Nambara E., Kawaide H., Kamiya Y., Naito S. (1998) – Characterization of an *Arabidopsis thaliana* mutant that has a defect in ABA accumulation: ABA-dependent and ABA-independent accumulation of free amino acids during dehydration. *Plant & Cell Physiology* 39 (8), 853-858.
- ✓ Peng J.R., Richards D.E., Moritz T., Cano-Delgado A., Harberd N.P. (1999) – Extragenic suppressors of the *Arabidopsis* gai mutation alter the dose-response relationship of diverse gibberellin responses. *Plant Physiology* 119 (4), 1199-1207.
- ✓ Xiong L.M., Ishitani M., Zhu J.K. (1999) – Interaction of osmotic stress, temperature and abscisic acid in the regulation of gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 119 (1), 205-211.

#### ◆ **Laboratoires reconnus**

- ✓ CPRO-DLO, 6700 AA Wageningen, The Netherlands. Steven P.C. Groot, Raoul J. Bino.
- ✓ EMBRAPA-National Center for Soybean Research, 86001-970 Londrina, PR, Brazil.
- ✓ Laboratoire de biologie des semences INRA-INA, 75 231 Paris Cedex 05. M. Caboche, A. Marion-Poll, M. Jullien, [jullien@versailles.inra.fr](mailto:jullien@versailles.inra.fr), P. Grappin.
- ✓ UMR CNRS/Aventis, Laboratoire de physiologie cellulaire végétale, 69 263 Lyon Cedex 09. D. Job, [dominique.job@aventis.com](mailto:dominique.job@aventis.com)
- ✓ USDA-ARS, university of Florida, Gainesville FL 32611-0770, USA. S.H. West.

## LONGEVITE DES GRAINES

### ◆ **Résultats acquis par la recherche**

Le vieillissement des graines a fait l'objet de nombreux travaux sur les processus impliqués au niveau physiologique et cellulaire, sans aboutir cependant à une distinction précise des événements primordiaux de ceux qui n'en seraient que la conséquence. Ainsi, distingue-t-on principalement au cours du vieillissement des graines, les dégâts nucléiques (et aberrations chromosomiques), les changements enzymatiques et les détériorations membranaires (Smith et Berjak, 1995).

Des travaux plus récents précisent les enzymes concernées par la perte d'activité catalytique, notamment les enzymes de détoxification cellulaire (superoxyde dismutase), les lipoxygénases et les peroxidases. Les dégâts membranaires liés au vieillissement s'expliquent par les dégradations lipidiques dues à des peroxydations (Walters, 1998). La cinétique des différents événements décrits ci-dessus est étroitement liée aux conditions de conservation des graines. Empiriquement, on sait depuis longtemps (Priestley, 1986) que deux facteurs sont essentiels : température et humidité.

### ◆ **Recherches en cours**

Avec la sauvegarde des ressources génétiques par le biais des semences, des travaux plurispécifiques intégrant les protéagineux sont développés afin de parfaire les conditions de stockage des semences. Les deux principales équipes qui travaillent sur ce sujet sont : d'une part, le conservatoire de Fort Collins (USA) qui, en collaboration avec l'ATO-DLO de Wageningen, explore les voies physiologiques de la dégradation des semences en fonction des conditions de stockage (Leprince et Walters-Vertucci, 1995). D'autre part, le département d'agriculture universitaire de Reading (UK) mène des travaux visant à modéliser la longévité des graines selon les conditions de conservation.

Des travaux plus spécifiques au soja, plus particulièrement sensible au vieillissement du fait de ses réserves lipidiques, sont développés au Brésil (université de Sao-Paulo) et aux Etats-Unis (universités du Kentucky et de l'Ohio). Ils concernent l'étude des processus oxydatifs et des réponses cellulaires de détoxification liés au vieillissement chez cette espèce.

### ◆ **Références bibliographiques**

- ✓ Leprince O. & Walters-Vertucci C. (1995) – A calorimetric study of the glass transition behaviors in axes of bean seeds with relevance to storage stability. *Plant Physiology* **109** (4), 1471-1481.
- ✓ Priestley D.A. (1986) – Seed aging. Implications for seed storage and persistence in the soil. Comstock Publishing Associates, Ithaca, New-York, London, 304 p.
- ✓ Smith M.T. & Berjak P. (1995) – Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds. In Kigel J., Galili G. (eds.) *Seed development and germination*. Marcel Dekker Inc., New-York, pp. 701-746.
- ✓ Walters C. (1998) – Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. *Seed Science Research* **8**, 223-244.

### ◆ **Laboratoires reconnus**

- ✓ USDA-ARS National Seed Storage Laboratory, Mason Street, Fort Collins, Colorado 80521, USA. Christina Walters, [chrisv@lamar.colostate.edu](mailto:chrisv@lamar.colostate.edu)
- ✓ University of Reading, Department of Agriculture, Earley Gate, Reading RG6 6AT, UK. R.H. Ellis, E.H. Roberts, [r.h.ellis@reading.ac.uk](mailto:r.h.ellis@reading.ac.uk)

♦ **Commentaires et perspectives**

*L'INRA tend à occuper une place importante dans la recherche cognitive des mécanismes liés à la germination.* Un de ses atouts réside dans la coexistence de deux modèles : une espèce générique impliquée dans un séquençage génomique systématique (*Arabidopsis*), objet de collaborations internationales et une espèce d'intérêt agronomique (pois) avec pour perspective la constitution d'une UMR à Angers (GIS actuel et INRA) en physiologie moléculaire des semences sur ce modèle.

Il est très difficile de dire à l'heure actuelle quel va être l'axe de recherche prédominant sur ce thème « Biologie de la germination ». *Il est néanmoins vraisemblable que des approches privilégiant l'identification de marqueurs précoces de la germination vont être favorisées du fait d'une utilisation appliquée dans la prévision de la qualité des lots de semences.*

Ce sont en particulier les travaux menés sur la recherche de marqueurs biochimiques et moléculaires (protéines, enzymes, mitochondries) de la germination.

*En ce qui concerne la longévité des semences, les protéagineux du fait de la nature même de leurs réserves séminales ne sont pas la cible privilégiée des études sur la conservation des graines.* Quant au soja, il tend à être supplanté par le tournesol pour les espèces oléagineuses car il vieillit trop rapidement lors des études en laboratoire (vieillesse accéléré).

## 3.2 Fonctionnement de la plante et du peuplement

### Introduction

En France les problèmes agronomiques posés par la production de protéagineux, essentiellement le pois, concernent l'instabilité du rendement et de la teneur en protéines des graines, ainsi que leurs niveaux potentiels. Les graines de protéagineux sont principalement utilisées comme source de protéines en complément des céréales. Cette production tient donc une position difficile entre les céréales, pauvres en protéines mais très productives en biomasse récoltable, et le soja à rendement moindre mais très riche en protéines.

L'introduction récente de la culture de pois, espèce indéterminée, dans les systèmes de cultures a conduit à privilégier dans un premier temps l'acquisition de références. Comme pour les autres espèces cultivées, le nombre de graines est la composante la plus explicative des variations de rendement. Contrairement aux espèces à port déterminé, une forte production de biomasse n'est pas forcément gage d'un fort rendement. Cette absence de corrélation provient de l'architecture de ce groupe d'espèces qui peut être très variable suivant les conditions environnementales (nombre de ramifications, de nœuds végétatifs et reproducteurs). Cette morphologie complexe entraîne des compétitions importantes pour la répartition des assimilats entre organes récoltables et les autres organes, et donc l'élaboration du rendement.

## PHENOLOGIE

### ◆ Enjeux

Les légumineuses à graines se caractérisent par une *séquentialité du développement* le long de la tige. Ce phénomène entraîne une compétition pour les assimilats entre des organes de natures et d'âges différents à un instant donné, compétition qui a une incidence déterminante sur l'élaboration du rendement. L'étude du développement comporte i) *l'identification de stades de développement à l'échelle de l'organe*, pertinents pour l'analyse de l'élaboration du rendement, suivie de ii) l'intégration à l'échelle de la plante de la succession des stades de développement.

### ◆ Résultats acquis par la recherche

La vitesse d'émission des phytomères, caractéristique génotypique, augmente linéairement avec la température, et cela même en conditions de contrainte thermique ou hydrique. Le nombre de phytomères émis est déterminé par la date d'initiation florale. Celle-ci est liée à la photopériode et à la température moyennes avant initiation florale.

De nombreux travaux ont porté sur le développement reproducteur. Sur trois espèces (pois, lupin, soja), trois stades déterminants pour la caractérisation du développement ont été identifiés et la progression de ces stades le long de la tige a été étudiée.

La formalisation de la phénologie dans un schéma conceptuel a permis de dégager des variables développementales sensibles aux conditions environnementales et de croissance :

- ✓ un modèle simple et mécaniste, s'appliquant au pois et au lupin blanc de printemps a été proposé, qui donne la date de début de floraison. Comparé à des modèles empiriques, ce modèle présente l'intérêt d'intégrer les processus de développement, en distinguant des effets précoces avant initiation florale et des effets généraux sur la vitesse de développement. Pour le pois, un travail de comparaison de différents modèles simulant le début de la floraison a permis de discuter les avantages et les inconvénients des différents types de modèles. Il permet ainsi d'aider au choix du type de modèle et des variables explicatives les mieux adaptées en fonction du cultivar et des objectifs de simulation. Des travaux similaires ont été réalisés par l'équipe anglaise de Summerfield.

- ✓ le caractère indéterminé du pois entraîne une variation importante du nombre d'étages reproducteurs selon les conditions environnementales. Un modèle prédictif du nombre d'étages reproducteurs utilisant uniquement des paramètres de développement a été construit. Ce modèle relativement simple permet de rendre compte des différents types de comportements variétaux.

Ces travaux d'écophysiologie ont été utilisés pour la sélection variétale, car les rythmes de développement sont des caractéristiques génotypiques déterminantes pour l'élaboration du rendement.

Une grande variabilité génétique des rythmes de développement a été mise en évidence chez le pois permettant ainsi de préciser les relations entre ces variables et les rendements obtenus. En fonction de la connaissance de ces variables, de leur pertinence et de leur accessibilité par les sélectionneurs, les possibilités de sélection sur ces variables ont été identifiées. Par l'étude d'un plan de croisement diallèle, l'héritabilité des caractères a été étudiée ainsi que les lignées pouvant être des géniteurs intéressants pour la construction d'un idéotype de pois.

Les données rassemblées conduisent à ébaucher une modélisation du développement reproducteur des espèces étudiées. L'intérêt d'une telle formalisation est i) de donner à chaque instant l'âge de tout organe et son état sur chacun des noeuds tout en délimitant la période au cours de laquelle est déterminé le nombre moyen de graines sur chaque position morphologique dans le couvert, ii) de définir avec précision l'ensemble des organes qui sont en compétition à un instant donné vis-à-vis des ressources produites.

#### ◆ **Recherches en cours**

Aucun programme spécifique sur la modélisation du développement n'est actuellement en cours. Sur le plan international, aucune grande équipe s'intéressant aux aspects phénologiques n'a été identifiée, si ce n'est pour des aspects architecturaux ou des travaux nécessaires pour l'étude de la résistance aux stress abiotiques (cf § Architecture et § Stress abiotiques).

#### ◆ **Commentaires et perspectives**

*L'approche française visant à prendre en compte l'indétermination des espèces considérées, s'est avérée très originale à l'échelle internationale* (en particulier par rapport à celle proposée dans les modèles du type Soygro - cf. Conclusion sur l'élaboration du rendement). En effet seuls quelques travaux récents sur soja ont développé ce type d'approche. ***Le besoin de connaissances sur la phénologie nécessaires à la constitution de modèles écophysiologiques ou bien à la caractérisation génotypique est actuellement satisfait*** par les travaux réalisés à l'INRA au cours des dernières années. Ce travail s'est avéré exemplaire sur l'intérêt de la prise en compte des connaissances écophysiologiques pour la caractérisation génotypique indispensable à la sélection variétale. Le niveau de complexité atteint par les modèles phénologiques conduit à la suspension de travaux spécifiques dans ce domaine. Il est notable que l'approche développée sur les protéagineux (espèces à phénologie complexe due à leur croissance indéterminée et floraison étalée) a été en son temps novatrice et a permis d'appréhender dans les modèles écophysiologiques de façon plus rigoureuse et performante les aspects développementaux à l'échelle de l'organe, mais aussi le rôle de la nature et de l'âge des organes dans les travaux sur la répartition des assimilats. ***Cette démarche initiée dans les années 80 a été pour partie transférée sur d'autres espèces.***

A l'échelle internationale, les réponses phénologiques à la température et à la photopériode (c'est-à-dire le passage d'un état morphologique ou physiologique au suivant, et notamment le début de la floraison) sont étudiées afin de déterminer l'adaptation des cultures à différents environnements et d'orienter ainsi les programmes de sélection en fonction d'environnements spécifiques.

Dans le contexte de l'amélioration de la résistance au gel du pois d'hiver, un travail spécifique a été réalisé à l'INRA de Mons pour modéliser le passage à l'initiation florale en réponse à la température et à la photopériode. Les acquis de ce programme de recherche sont détaillés dans le paragraphe consacré aux stress abiotiques. Par ailleurs, pour le pois d'hiver, les modèles devront probablement être complexifiés par les aspects de mise en rosette des plantes, de photopériodisme ou de vernalisation.

### ◆ **Références bibliographiques**

- ✓ Summerfield R.J., Roberts E.H., 1988 : Photothermal regulation of flowering in pea, lentil, faba bean and chickpea. In *World crops : cool season food legumes*, R.J. Summerfield éd., Kluwer Academic Publishers.
- ✓ *Agrophysiologie du pois*, 1994. UNIP, INRA ITCF (Eds).

### ◆ **Laboratoires connus**

- *Etrangers*
  - ✓ Department of Agriculture, University of Reading, UK (R.J Summerfield)
  - ✓ Pontificia Universidad Catolica de Chile, Chili (J.A. Alcade)
- *France*
  - ✓ INRA GAP Mons
  - ✓ INRA Unité de Malherbologie et Agronomie Dijon
  - ✓ INRA Agro Montpellier LEPSE, Montpellier

## ARCHITECTURE

### ◆ **Enjeux**

En amélioration des plantes, modifier l'architecture des plantes peut avoir plusieurs objectifs : ***maximiser et stabiliser le rendement en augmentant la biomasse produite ou en favorisant la répartition des assimilats vers le compartiment reproducteur, améliorer la résistance à la verse ou la résistance aux pathogènes.*** Un autre objectif majeur est d'***adapter le cycle de culture aux conditions environnementales*** (résistance au froid ou à la sécheresse, maturation des graines...). De nombreux caractères sont impliqués dans l'élaboration de l'architecture d'une plante: la longueur et le nombre des entre-noeuds, la morphologie foliaire, le nombre de ramifications et leur position sur la tige principale, la précocité de floraison... Ainsi, chez la plupart des espèces cultivées pour leurs graines, la répartition des assimilats vers le compartiment reproducteur a été favorisée en modifiant la date de floraison, la hauteur de la plante (gènes de nanisme) et/ou le degré de ramification de la plante.

Comme il a été rappelé précédemment, une des particularités de l'architecture des légumineuses à grosses graines est leur ***croissance indéterminée.*** ***Ce type d'architecture peut entraîner un cycle de développement prolongé*** avec des conséquences sur la maturation des graines et à une forte compétition entre la croissance végétative et la fonction de reproduction pour la répartition des assimilats. Cette aptitude à prolonger la croissance végétative après l'initiation florale peut entraîner des indices de récolte faible et des rendements bas et instables.

Chez des espèces sélectionnées depuis relativement peu de temps pour la production intensive, comme les légumineuses à grosses graines, des progrès génétiques importants et rapides peuvent être obtenus par l'utilisation de mutations à effets majeurs. On peut citer chez le pois protéagineux l'exemple du gène de nanisme *le* ou de la mutation *afila* (transformation des folioles en vrilles) qui ont, entre autres, considérablement amélioré la résistance à la verse. D'autres voies génétiques sont possibles pour donner par exemple à la plante une croissance plus déterminée : utiliser des mutations conférant à la plante ce type de croissance (*det* chez le pois ou le lupin) ou augmenter la ramification basale de la plante : un plus grand nombre de tiges par plante entraîne un nombre d'étages fructifères par tige plus faible et donc une moins forte compétition entre les gousses en cours de remplissage.

Actuellement, un des enjeux majeurs est d'accéder à la séquence des gènes eux-mêmes pour les utiliser directement comme marqueurs moléculaires et suivre l'introgression d'un allèle donné dans des fonds génétiques d'intérêt agronomique. Les recherches menées sur l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* et le clonage de gènes contrôlant l'architecture de la plante chez cette espèce permettent par homologie de séquence d'identifier le gène orthologue chez les espèces cultivées. On peut citer l'exemple du gène de nanisme *Le* étudié par Mendel : sa caractérisation biochimique précise (il intervient dans la voie de biosynthèse des gibbérellines et code pour la 3 $\beta$ -hydroxylase qui permet la conversion de GA20 en GA1), a permis d'identifier le mutant correspondant chez *Arabidopsis*. Le gène GA4 d'*Arabidopsis* a été cloné par T-DNA tagging. Par homologie de séquences, le gène *Le* a pu être ainsi cloné chez le pois (Martin et al. 1997 ; Lester et al. 1997).

#### ◆ Résultats acquis par la recherche

##### • Le pois

Chez cette espèce modèle en génétique, de nombreuses mutations modifiant l'architecture de la plante ont été identifiées et souvent très bien caractérisées d'un point de vue physiologique et biochimique. Depuis une trentaine d'années l'équipe de Murfet et Reid (Université de Hobart, Tasmanie, Australie) ont caractérisé les gènes de pois contrôlant la précocité de floraison et la sensibilité à la photopériode (voir § Stress abiotiques) et les gènes contrôlant la longueur des entre-nœuds. Plus récemment, des mutants affectés spécifiquement dans le degré de ramification de la plante ont été rassemblés par I.C. Murfet et leur caractérisation est en cours à l'Université de Brisbane en collaboration avec l'INRA de Versailles.

Parmi la quinzaine de gènes contrôlant la longueur des entre-nœuds chez le pois, il semble que seul le gène *Le* (précisément l'allèle *le-1*) ait été utilisé en sélection. La plupart des autres gènes de nanisme semblent avoir des effets pléiotropiques notamment sur la fertilité ou la morphologie foliaire et n'ont donc pas d'intérêt agronomique.

##### • Le lupin

Chez le lupin blanc, l'intérêt agronomique de gènes de nanisme et d'un gène conférant une architecture déterminée a été démontré par le laboratoire INRA de Lusignan : l'architecture déterminée, qui conduit à une réduction du nombre de niveaux de ramifications et du nombre de feuilles portées par les ramifications, est sous le contrôle d'un seul gène, l'allèle 'déterminé' étant récessif. Il existe plusieurs sources de nanisme. Le caractère de nanisme utilisé en sélection réduit la longueur des entre-nœuds de la tige principale et des ramifications, sans affecter la taille des feuilles ni des gousses. Ce caractère est contrôlé par deux gènes. L'architecture déterminée permet de limiter fortement le développement végétatif, limitant ainsi les compétitions pour les assimilats entre la croissance reproductive et la croissance végétative. Le rendement est largement stabilisé, et la date de récolte est avancée, surtout dans les régions à climat frais et humide. Le nanisme permet de réduire les risques de verse. L'introduction du nanisme et de l'architecture déterminée en sélection du lupin d'hiver permet de produire des génotypes à fort niveau de rendement potentiel, avec une meilleure stabilité de ce rendement, pour lesquels les risques de verse sont réduits et qui pourront être récoltés précocement en été.

#### ◆ Recherches en cours

L'étude du contrôle génétique de la ramification chez le pois est actuellement en cours à l'INRA de Versailles en collaboration avec le laboratoire de Brisbane. Cette étude est basée sur une collection de mutants de développement caractérisés d'un point de vue génétique, physiologique et moléculaire.

Cette collection est certainement celle qui rassemble dans une même espèce le plus grand nombre de mutants affectés spécifiquement dans le degré de ramification de la plante. Les mutations *ramosus* augmentent la ramification de la plante sans modifier d'autres caractères (mutations non-pléiotropiques) contrairement à la plupart des mutations isolées chez l'espèce modèle *Arabidopsis* par des cribles de résistances à des hormones telles que l'auxine et les cytokinines qui confèrent souvent une plus ou moins grande stérilité en plus d'un aspect "bushy". L'importance agronomique des gènes correspondant aux mutations *rms* est par conséquent essentielle (pour le pois mais aussi pour d'autres espèces) du fait de leur spécificité d'action. Parmi les 7 gènes *rms* identifiés, 2 affectent uniquement la ramification

basale de la plante et ont donc un intérêt agronomique potentiel pour le pois. L'étude précise de ces mutants (greffes, quantifications endogènes des auxines et des cytokinines) remet en cause les données classiques sur la dominance apicale. Notamment, de nouveaux signaux autres que les hormones auxine et cytokinines semblent impliqués dans ces phénomènes de ramification.

Plus récemment, une mutagenèse "réverse" sur 2 mutants ramifiés (*rms3* et *rms4*) a été effectuée dans l'objectif de sélectionner des mutants "suppresseurs de la ramification". Il semble que ces mutants vont permettre d'aborder de nouveaux aspects du contrôle génétique de la ramification : l'initiation de bourgeons axillaires et le potentiel de développement d'un bourgeon axillaire en fonction de sa position sur la tige principale.

#### ♦ **Commentaires et perspectives**

- *Intérêt d'une architecture déterminée pour le pois d'hiver : introgression et combinaisons de différentes mutations dans un contexte "hiver"*

*Parmi les mutations ramosus, les gènes rms6 et rms7 ont un intérêt agronomique potentiel puisqu'ils ne jouent que sur la ramification basale de la plante.* Les nouveaux mutants issus de la mutagenèse réverse sont aussi prometteurs : certaines mutations ("dormant") en bloquant les ramifications supérieures devront être combinées à la mutation *det* (croissance déterminée) dont l'intérêt agronomique est réduit du fait du démarrage de nouvelles ramifications au moment de l'initiation florale. Cependant, montrer l'intérêt agronomique d'une mutation nécessite de l'introduire dans une gamme de variabilité large. Un programme entre l'INRA de Mons et de Versailles est en cours d'élaboration pour introduire ces mutations associées aux mutations *Hr* et *Lf* contrôlant l'initiation florale dans un contexte "hiver" (voir § Stress abiotiques).

- *Identification moléculaire des gènes (voir § Génomique)*

La connaissance de la séquence de gènes d'intérêt permet d'utiliser ces gènes directement comme marqueurs moléculaires spécifiques des différents allèles : ainsi pour le gène *Le*, l'utilisation d'autres allèles que l'allèle *le-1* ayant des effets plus forts (*le-2*) ou moins forts (*le-3*) sur la longueur des entre-noeuds n'est possible qu'en utilisant des marqueurs PCR spécifiques de chaque allèle (génotypage).

*Actuellement, de nombreux laboratoires travaillant sur le pois cherchent à identifier les gènes homologues de gènes clonés chez d'autres espèces (en général Arabidopsis) et intervenant dans le contrôle de l'architecture de la plante* (longueur des entre-noeuds, morphologie foliaire, précocité de floraison, ramification). Ces homologues sont cartographiés et leur position par rapport à des mutations connues chez le pois est analysée. C'est un des objectifs de l'un des projets Génoplante.

#### ♦ **Références bibliographiques**

- ✓ Huyghe C (1998) Genetics and genetic modifications of plant architecture in grain legumes : a review. *Agronomie* 18:383-411.
- ✓ Murfet IC & Reid JB (1993) Developmental mutants. In : Casey R, Davies DR (eds). *Peas : genetics, molecular biology and biotechnology*. CAB Int, Wallingford, UK, pp 165-216.

#### ♦ **Adresses des laboratoires connus**

- ✓ I.C. Murfet & J.B. Reid

Department of Plant Science, University of Tasmania, G.P.O. Box 252-55, Hobart, Tasmania 7001 Australia.

- ✓ C. Beveridge

Department of Botany, The University of Queensland, St Lucia, Brisbane 4072, Australia

## ACQUISITION DES RESSOURCES CARBONEES ET NUTRITION AZOTEE

### ◆ *Enjeux*

La croissance du peuplement végétal détermine à chaque instant la quantité d'assimilats carbonés et azotés que doivent se partager les différents organes en croissance en particulier les organes récoltables. La variabilité génétique et celle due aux conditions environnementales ont été prises en compte afin de :

- ✓ *définir les conditions de milieu et les conduites de culture favorables à une nutrition carbonée et azotée optimales,*
- ✓ *proposer les géotypes les plus performants en fonction des conditions de milieu.*

### ◆ *Résultats acquis par la recherche*

#### • *Acquisition du carbone*

L'analyse de la croissance du peuplement repose classiquement sur l'étude de la conversion du rayonnement photosynthétiquement actif en matière sèche. Cette analyse conduite pour le pois et le lupin blanc tient compte de la seule croissance aérienne.

L'efficacité d'absorption du rayonnement  $\epsilon_a$  évolue au cours du temps selon une fonction logistique de la somme de degrés-jours cumulés depuis la levée, dont les paramètres dépendent essentiellement de la densité de semis au travers de la durée de la période levée-fermeture du couvert. A une densité élevée, l'évolution de cette efficacité est indépendante de l'année et du géotype.

Dans un premier temps, l'efficacité de conversion  $\epsilon_p$  du rayonnement absorbé en matière sèche, calculée sur la base de mesures hebdomadaires pour plusieurs géotypes de chaque espèce, a été estimée peu variable jusqu'à la fin de la floraison, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus pour d'autres légumineuses. Cependant, des travaux actuellement en cours en France et dans le monde montrent par une analyse plus fine de l'évolution de l' $\epsilon_p$  que l'efficacité de conversion du rayonnement n'est pas constante au cours du temps. Ces variations dépendent de la date de semis, de la densité de semis et du géotype.

Le modèle de croissance du peuplement tel qu'il a été construit sur le pois et sur le lupin ne prend pas en compte la croissance racinaire. Chez le pois, la mesure de la biomasse racinaire au champ a montré sa très faible contribution à la biomasse totale. Ainsi sa prise en compte ne permet pas d'expliquer les variations d'efficacité de conversion du rayonnement en matière sèche au cours du temps.

#### • *Acquisition de l'azote*

L'interdépendance des nutriments carbonés et azotés, l'influence de l'azote dans les processus morphogénétiques font jouer à cet élément un rôle primordial dans l'élaboration du rendement et de la qualité des réserves (cf. AIP Agraf).

Des études menées sur lupin et sur pois (grâce à des mutants ne différant du parent que par le caractère non-nodulant ou fixateur) montrent la complémentarité des deux voies de la nutrition azotée. Les plantes absorbent préférentiellement l'azote minéral disponible et couvrent leurs besoins par un complément d'origine symbiotique, qui en conditions optimales de croissance couvre environ 80 % des besoins. En condition satisfaisante de nutrition azotée, l'accumulation d'azote par le peuplement est déterminée par sa propre dynamique de croissance. Ainsi, la loi de dilution de l'azote dans la matière sèche des plantes en C3 s'applique au pois. La teneur en azote des parties aériennes de plantes fixatrices de lupin blanc et de soja est en revanche remarquablement stable entre floraison et début remplissage des graines. Ces observations suggèrent un contrôle physiologique étroit de la quantité d'azote fixé, l'ajustement se faisant en fonction des besoins déterminés par la croissance. La teneur en azote des parties aériennes permet de juger de l'adéquation de l'accumulation d'azote à la demande, ce peut être aussi un indicateur de l'efficacité de la symbiose.

Les premiers travaux sur le pois (INRA Microbiologie des sols, Dijon) ont montré que l'installation de la symbiose avec *Rhizobium leguminosarum* dans les sols français ne constitue pas un facteur limitant. En revanche, l'efficacité de cette symbiose est ensuite régulée par des effets du milieu et du géotype de la plante.

Une action conduite en GAP (Dijon) à partir de 1980 a permis d'identifier une variabilité génétique importante chez le pois pour le fonctionnement de la voie fixatrice de  $N_2$ . Dans la variabilité spontanée, des géotypes se distinguent quant à leur aptitude à accumuler de l'azote en régimes de fixation ou assimilation stricts. Des mutants de plante ont été récemment sélectionnés qui présentent selon les cas une tolérance aux nitrates, une

hypernodulation, une senescence retardée des nodules ou enfin une répartition différente des nodules sur le système racinaire. Certains de ces phénotypes ont déjà été identifiés sur la plante modèle *Medicago truncatula*.

#### ◆ **Recherches en cours**

##### • **Acquisition du carbone**

Peu de travaux portent actuellement sur la croissance globale du peuplement en conditions potentielles. La modélisation de la croissance des peuplements de légumineuses a suivi le modèle proposé par Monteith (1972). La poursuite de ces travaux concerne, tant au niveau national qu'au niveau international, la modélisation de la conversion du rayonnement absorbé par la plante en matière sèche, afin d'appréhender les variations au cours du temps en relation avec la présence d'autres puits (évolution de la capacité photosynthétique au cours du cycle en relation avec les autres puits) ainsi que l'effet de l'environnement en conditions potentielles. Ce travail se fait en étroite relation avec les recherches portant sur les stress abiotiques et biotiques (contraintes hydriques ou thermiques, stress azoté, maladies). L'utilisation des modèles de croissance du peuplement (et en particulier de conversion du rayonnement en matière sèche) en conditions potentielles devrait permettre de décrire l'effet de différents facteurs du milieu. En particulier cette voie de recherche alliant agronomes et pathologistes est déjà engagée pour l'étude de l'effet des maladies aériennes sur les modifications de l' $\epsilon_b$ .

Pour les légumineuses, les grands modèles développés dans le monde (type Soygro dans le cadre de CROPGRO cf § infra Conclusion sur l'élaboration du rendement) sont conçus pour étudier l'effet des changements climatiques sur la production agricoles. Par conséquent ils ont adoptés une approche très mécaniste (modules de photosynthèse et de respiration très complexes) capable d'inclure l'action d'un grand nombre de facteurs environnementaux.

La création de maquettes 3D destinées à modéliser la croissance des plantes en fonction de leur environnement est actuellement en cours et est présentée dans le § Stress abiotiques.

##### • **Acquisition de l'azote**

Mise au point d'inoculum performants, problème de la compétition entre souches (soja) : la production des légumineuses peut être améliorée en optimisant la fixation d'azote par la gestion de partenaires bactériens adaptés aux espèces et par la maîtrise des conditions d'évaluation. Dans ce cadre, l'INRA (principalement l'Unité de Microbiologie des sols, Dijon et le LBMRPM, Toulouse) est fortement impliqué dans la mise au point d'inoculum performants pour la fixation symbiotique. Les contrôles génétiques identifiés en particulier chez le pois d'Afghanistan déterminent effectivement des spécificités plante-bactéries mais à terme il est probable que cette spécificité diffusera entre souches *in situ*. De nombreuses études concernent aussi l'influence de l'hôte et de facteurs abiotiques sur la survie et la capacité de compétition entre des populations de bactéries.

Reconnaissance plante-bactérie, morphogénèse des nodosités : l'aptitude des cellules racinaires pour le développement des nodosités est déterminé par des conditions environnementales et physiologiques tandis que l'organogénèse nodulaire est engendrée par les facteurs rhyzobiens hôtes-spécifiques (Nod), dont la synthèse et la structure sont à l'étude au sein de l'INRA (LBRPM de Toulouse ; Laboratoire des Symbioses tropicales et méditerranéennes de Montpellier). Les événements précoces du développement des nodosités y sont étudiés en considérant la perception et la transduction des signaux Nod, tant sur légumineuses cultivées que sur la plante modèle *Medicago truncatula*. Sur le plan international les diverses équipes s'attachent aussi à identifier puis à manipuler les gènes des légumineuses hôtes impliqués dans la reconnaissance de la bactérie durant les étapes précoces de la morphogénèse du nodule et durant la fixation de l'azote.

Fonctionnement des nodosités : le programme de développement des nodosités est sous le contrôle des facteurs Nod sécrétés par les bactéries et agissant comme des morphogènes. L'état symbiotique est ensuite maintenu par l'échange de carbone et d'azote entre chaque organisme.

Le fonctionnement des nodosités et le transfert de l'azote réduit sous forme de composés azotés vers les parties aériennes nécessitent la fourniture de composés carbonés fournis par la photosynthèse courante et accessoirement par la fixation de  $\text{CO}_2$  au sein des nodosités. L'activité respiratoire des cellules infectées du tissu central des nodosités fournit l'énergie nécessaire à la réduction de l'azote atmosphérique en ammoniac par la nitrogénase contenus dans les bactéroïdes des cellules infectées. La nitrogénase étant  $\text{O}_2$  labile, la régulation de la concentration en  $\text{O}_2$  s'effectue au niveau de cellules du cortex nodulaire qui constituent « la barrière de diffusion à l' $\text{O}_2$  » (Minchin et Witty, 1990). Cette barrière de diffusion à l'oxygène et sa régulation ont été l'objet de nombreux travaux effectués ces dernières années par les équipes de Layzell (Queen's University, Canada) ou bien encore Minchin (AFRC, GB). L'activité de la fixation symbiotique a été étudiée au niveau (i) de la modulation de la perméabilité à l'oxygène, (ii) des voies métaboliques carbonée et azotée, (iii) des mécanismes par lesquels les réserves azotées du sol inhibent les enzymes impliquées dans la fixation symbiotique.

Tandis que les travaux des équipes internationales se situent au niveau de l'efficacité du métabolisme carboné au sein des nodosités, sur le plan énergétique les équipes INRA (en particulier l'Unité de Malherbologie et Agronomie, Dijon) travaillent principalement au niveau plante entière. Les études en cours visent à établir les règles de fonctionnement du compartiment racinaire du pois, en considérant l'état carboné de la plante et les relations sources-puits entre les différents organes. L'efficacité du prélèvement d'azote est quantifiée en fonction de la mise en place du système racinaire, du coût en carbone du fonctionnement des nodosités, des interactions entre assimilation et fixation en relation avec la disponibilité en azote minéral du sol, de l'état carboné de la plante et les compétitions entre puits qui conditionnent les flux d'assimilats parvenant aux organes.

De hautes concentrations en nitrate dans le sol inhibent (i) la formation des nodosités et (ii) l'activité de la nitrogénase. L'exposition au  $\text{NO}_3^-$  entraîne une réduction de la fourniture en  $\text{O}_2$  aux cellules infectées, de leur vitesse de respiration et de l'activité de la nitrogénase. Les travaux d'équipes étrangères ont conduit à la proposition de plusieurs hypothèses afin d'expliquer l'effet inhibiteur du nitrate et le rôle joué par l' $\text{O}_2$  : inhibition par effet local, impliquant une régulation osmotique ou bien systémique par le biais d'un signal contenu dans les sèves parvenant au système racinaire.

Bien que de nombreuses équipes s'intéressent à l'effet de la présence de nitrate sur la fixation symbiotique, seule l'équipe d'agronomie de l'INRA de Dijon réalise ses études selon la phénologie en étudiant la modification des flux des sèves parvenant au système racinaire, en relation avec la nature, la quantité et le stade des organes pouvant entrer en compétition pour les assimilats avec le puits nodosités.

A l'exception de l'azote, le phosphore s'avère limitant dans la plupart des sols. La disponibilité en phosphore a un impact sur l'établissement et le fonctionnement de la symbiose bactérie-légumineuse. Les travaux portent en particulier sur l'allocation et l'utilisation du phosphore par les bactéroïdes.

Par ailleurs plusieurs voies sont actuellement explorées afin d'améliorer l'efficacité de prélèvement des ressources azotées au cours du cycle. Différentes équipes de l'INRA (URGAP de Dijon, GAP et Station de Recherches sur les symbiotes des racines de Montpellier) et à l'étranger principalement l'équipe canadienne de Vessey cherchent à allonger de la durée de fixation par voie génétique en produisant des lignées tolérantes aux nitrates ou bien des mutants hypernodulants

L'action en génomique en cours sur la légumineuse modèle *Medicago truncatula* permettra de combler le manque de connaissances concernant le fonctionnement des espèces agronomiques et notamment des légumineuses cultivées, sur la base des synténies, des homologies de séquence et de régulation que l'on attend pour les gènes impliqués. Ces manques de connaissances concernent (i) les relations plantes/micro-organismes en relation avec les conditions environnementales qui affectent leur fonctionnement, (ii) les étapes limitantes du prélèvement d'azote et de sa valorisation par la plante ainsi que (iii) des marqueurs d'événements du fonctionnement de la plante lors de stades clefs (sénescence, remobilisation des assimilats vers les graines...). Pour cela l'expression du génome en réponse aux contraintes biotiques ou abiotiques est analysée massivement à l'aide d'une variabilité génétique disponible (mutants de pois et de *Medicago truncatula*). Les gènes clefs dont l'expression est modifiée par ces contraintes sont repérés grâce à l'obtention de cribles pertinents et de modèles réalisés par l'écophysiologie. Ce travail est réalisé dans le cadre du Projet Structurant *Medicago truncatula* (coordonnateur : Dénarié).

#### ◆ **Commentaires et perspectives**

##### • *Acquisition du carbone*

*La production de légumineuses en France s'insère dans des systèmes de production relativement intensif.* L'une des caractéristiques de ces systèmes est de s'affranchir au maximum des facteurs limitants de la production et ainsi de viser l'obtention d'un rendement potentiel, objectif envisageable du fait des faibles besoins de la culture et de sa bonne adaptations aux conditions de l'Europe septentrionale. *Ces contraintes propres aux systèmes de productions français, voir nord-européens, ont très fortement influencé les actions de recherche en particulier en agronomie,* où les travaux ont porté en grande partie sur l'analyse du fonctionnement de la culture en conditions potentielles. *Au contraire la recherche internationale en agronomie, en réponse à des conditions de productions plus extensives* (zones sèches en particulier) (CLIMA Australie, USDA USA, ICARDA) *ont très fortement axé leurs recherches sur l'études des facteurs limitants tant biotiques qu'abiotiques.*

##### • *Acquisition de l'azote*

Les recherches concernant les voies d'acquisition de l'azote ont pour objectif d'obtenir une agriculture durable et respectueuse de l'environnement, d'augmenter le potentiel de production en obtenant la stabilité des rendements et de leur qualité et à terme de transférer à des non légumineuses la capacité de fixer l'azote atmosphérique.

Une partie des recherches conduites par l'INRA porte sur *l'identification et la caractérisation d'inoculum, l'étude des mécanismes de reconnaissance précoces hôte-bactérie et la variabilité génétique des caractères impliqués dans la symbiose.* Des perspectives intéressantes proviennent d'études étrangères en cours sur (i) la capacité à faire produire par les bactéries des molécules anti-rhizobium leur permettant une meilleure occupation des sols dans les conditions agronomiques en comparaison des souches isogéniques, (ii) l'addition de gènes HUP (uptake hydrogenase) aux inoculums qui améliorent le rendement de la nitrogénase, (iii) l'identification de gènes antibiotiques ou de phénotypes bactériens ayant des caractéristiques de mobilité ou de surface cellulaire pouvant contribuer à une meilleure compétition, (iv) l'identification de gènes de la plante déterminant la reconnaissance de rhizobium et mycorhizes.

*Une autre partie des recherches conduites à l'INRA, très originale au niveau international, concerne le fonctionnement des nodosités en regard de l'état carboné de la plante entière et des compétitions pour l'allocation des assimilats.* Dans ce champ de recherche, les quelques équipes étrangères limitent leurs travaux à l'étude détaillée du métabolisme au sein des

nodosités ou en relation avec les flux de C et N leur parvenant (Queen's University, Canada ; CLIMA, Australie ; University of Manitoba, Canada).

L'interaction entre assimilation et fixation en relation avec la disponibilité en azote minéral du sol ainsi que l'influence de la nutrition phosphorée sur l'activité symbiotique sont aussi traités par l'INRA et des équipes étrangères.

Enfin l'étude génétique des mutations concernant l'efficacité de prélèvement des ressources azotées est en cours et des actions de cartographie génétique accompagnées du développement de la génomique sur pois et *Medicago truncatula* permettront à terme l'isolement des gènes impliqués.

En ce qui concerne l'*approche de génomique fonctionnelle sur Medicago truncatula*, l'analyse quantitative et qualitative des fonctions ou de composés stratégiques permettra de définir l'originalité de ce modèle par rapport à *Arabidopsis* et de caractériser des gènes d'intérêt à rechercher, ou une régulation originale à analyser. Cette action permettra aussi de préciser les croisements dans lesquels une cartographie de QTL pourra ultérieurement être engagée.

#### ◆ **Références bibliographiques**

- ✓ Sinclair T.R., Muchow R.C., 1999. Radiation Use efficiency, *Advances in Agronomy*.
- ✓ Layzell D.B., Moloney A.H.M., 1994. Dinitrogen fixation. In: *Physiology and determination of crop yield*. K.J. Boote, J.M. Bennett, T.R. Sinclair, G.M. Paulsen. ASA, Madison, USA.

#### ◆ **Adresses des laboratoires connus**

##### • *Acquisition du carbone*

##### *Etranger*

- ✓ USDA Gainesville, Floride, USA (T.R. Sinclair)

##### *France*

- ✓ INRA Unité de Malherbologie et Agronomie, Dijon
- ✓ INRA Agro Montpellier LEPSE, Montpellier
- ✓ INRA, INA-PG, Unité d'Agronomie, Grignon

##### • *Acquisition de l'azote*

##### *Etranger*

- ✓ University of Manitoba, Canada (K. Vessey)
- ✓ Queen's University, Canada (D.B. Layzell)
- ✓ CLIMA, Australia (J.S. Pate, C.A. Atkins)

##### *France*

- ✓ INRA GAP, Dijon
- ✓ INRA Unité de Malherbologie et Agronomie, Dijon
- ✓ INRA CMSE, Dijon
- ✓ INRA LBRPM, Toulouse
- ✓ INRA Laboratoire des symbiotes tropicaux et méditerranéens, Montpellier

## REPARTITION DES FLUX DE CARBONE ET D'AZOTE

#### ◆ **Enjeux**

Les interactions entre le génotype et le milieu induisent un programme morphogénétique dont l'expression est plus ou moins sous la dépendance des fonctions trophiques. La mise en place des organes selon une chronologie que décrivent les schémas de développement est à l'origine

d'une demande en assimilats destinés à leur croissance et leur activité de maintenance. *La répartition des assimilats résulte du bilan entre l'offre, l'activité d'accumulation, et la somme des demandes assorties de priorités éventuelles.*

#### ◆ **Résultats acquis par la recherche**

##### • *Fonctionnement du puits graine (cf § 4.1.)*

La quantité d'assimilats disponible pour la fabrication du nombre de graines dépend pour partie du nombre de graines déjà en remplissage et de leur force d'appel de puits. Le caractère séquentiel du développement reproducteur sur la plante entraîne une phase plus ou moins longue de chevauchement dans l'élaboration des composantes nombre de graines et poids d'une graine, et, tant chez le pois, le soja ou le lupin, la demande en assimilats des graines en cours de remplissage est satisfaite prioritairement.

Le fonctionnement du puits graine est traité dans le § 4.1. concernant l'élaboration de la graine et sa composition.

##### • *Simulation du nombre de graines.*

L'absence de connaissances suffisantes sur la répartition des flux de carbone et d'azote entre les organes pourvoyeurs d'assimilats et les organes consommateurs, a conduit à la construction de modèles plus ou moins empiriques de simulation du nombre de graines par plante.

Chez le lupin, des règles empiriques de répartition de la matière sèche élaborée entre ordres d'axes et axes à l'intérieur d'un ordre ont été établies, confirmant la priorité absolue dont bénéficient les gousses dont les graines sont en phase de remplissage. Le nombre de graines à l'échelle de la gousse et de la ramification dépend de la croissance respective de la gousse et de l'axe. Un modèle partiellement similaire avait été établi sur pois.

Chez le pois un modèle empirique de répartition des graines sur la tige fondé sur le formalisme proposé pour simuler la surface des feuilles d'une tige de maïs a été construit et s'avère opérationnel en situations agricoles. Par ailleurs le modèle dynamique de répartition des assimilats et du nombre de graines proposé sur pois par Jeuffroy (1991) a été amélioré en particulier par une méthode originale d'estimation de la demande végétative par optimisation.

#### ◆ **Recherches en cours**

Les études sur la répartition des flux de C et N effectuées durant ces dernières années (Australie, Canada...) ont permis d'obtenir des cartes de flux dans les différents compartiments pour une période donnée. Ces approches ont permis d'acquérir un ensemble de connaissances physiologiques, biochimiques et structurales sur le fonctionnement des organes des légumineuses avec pour objectif de déterminer avec quelle efficacité la plante et ses organes canalisent les assimilats vers la production de composés carbonés et azotés au sein des graines.

Ce type d'étude reposant sur des mesures des bilans en matière sèche des organes, de leur contenu en C et N, des échanges gazeux (photosynthèse et respiration) de la plante, de ses compartiments, des rapports C/N des sèves est désormais utilisé de manière marginale (principalement par les équipes australiennes). L'INRA conduit à présent des travaux sur la répartition des flux de C et N selon la phénologie en utilisant des pas de temps beaucoup plus courts (une journée contre 5 à 10 jours auparavant), en calquant les recherches de manière précise sur un modèle phénologique robuste, et en utilisant des techniques isotopiques de pointe (utilisation de  $^{15}\text{N}_2$  en particulier). Dans le sillage des études pionnières de Warembourg (CNRS, Montpellier), l'activité de la fixation symbiotique peut désormais être mesurée de manière absolue et précise au cours du temps.

### ◆ **Commentaires et perspectives**

Les études isotopiques permettront à terme de mettre en évidence les priorités existant entre organes.

*L'INRA se singularise par rapport aux équipes internationales par son approche trophique des relations inter-organes*, les équipes australiennes focalisant par contre une partie notable de leurs travaux sur la distribution et l'influence des hormones sur l'organogenèse des légumineuses.

L'INRA possède le potentiel nécessaire à la mise en place de recherches sur la nutrition azotée en relation avec l'élaboration du rendement (quantité et qualité des produits récoltés) par le biais d'interactions entre ses équipes de physiologistes, d'agronomes et de généticiens. L'obtention de cribles pertinents établis par les équipes d'écophysiologistes permettra la mise en évidence des gènes clefs impliqués dans le cadre des projets de génomique fonctionnelle de l'INRA conduits en parallèle sur *Medicago truncatula* et sur pois par les généticiens. L'objectif est à terme de définir un idéotype de nutrition azotée permettant d'orienter la sélection variétale.

### ◆ **Références bibliographiques**

#### ◆ **Adresses des laboratoires connus**

##### • *Etranger*

✓ Queen's University, Canada (D.B. Layzell)

✓ CLIMA, Australia (J.S. Pate, C.A. Atkins)

##### • *France*

✓ INRA, Unité de Malherbologie et Agronomie, Dijon

✓ INRA, INA-PG, Unité d'Agronomie, Grignon

✓ CNRS, CEFE, Montpellier

## STRESS ABIOTIQUES

### ◆ **Enjeux**

De nombreux travaux réalisés à l'INRA ont montré l'importance de la période de mise en place du nombre de graines pour l'élaboration du rendement du pois protéagineux. Pendant cette période relativement longue, la culture est très sensible aux fortes températures et aux éventuels stress hydriques, qui provoquent des avortements de fleurs et/ou de graines et pénalisent le rendement.

Dans ces conditions, le semis du pois en automne apparaît comme une alternative intéressante, car il permet :

- ✓ une plus grande précocité du début de la floraison, qui permet d'éviter les risques de fortes températures et de stress hydriques de fin de cycle;
- ✓ un allongement du cycle de développement, qui se traduit par une production plus importante de biomasse.

Ces deux éléments contribuent à l'amélioration de la productivité et de la stabilité du rendement.

Dans ce contexte, les enjeux scientifiques concernant l'études des stress abiotiques sont de plusieurs natures :

- ✓ alors que les pratiques agricoles évoluent vers une réduction des intrants (dont l'eau), il

- est nécessaire de *prévoir l'effet des contraintes environnementales sur la production*,
- ✓ *l'amélioration du niveau de résistance au gel de la culture devrait permettre de dépasser les facteurs qui limitent l'extension du pois d'hiver.*

#### ◆ **Résultats acquis par la recherche**

- **Modélisation de l'impact des fortes températures et des contraintes hydriques**

L'analyse de la mise en place de la morphogenèse foliaire a montré un effet marqué des stress abiotiques sur la surface foliaire. Les modèles proposés ont donc été intégrés dans le modèle de croissance globale du peuplement. L'efficacité d'absorption du rayonnement est réduite par les stress abiotiques au travers de la réduction de la surface foliaire par rapport au potentiel. De même, les contraintes abiotiques, en particulier un stress thermique de courte durée, entraîne une diminution réversible de l'efficacité de conversion du rayonnement absorbé par une diminution de la photosynthèse nette. Des modèles de simulations de ces effets ont été proposés, traduisant la réduction de production d'assimilats carbonés par des stress abiotiques.

Afin de construire le module de simulation de l'effet des contraintes, des modules de simulation de la température et du bilan hydrique en fonction des variables climatiques ont été conçus. Un module de bilan hydrique fondé sur une analogie de modèle réservoir à deux compartiments avec un rétrocontrôle entre l'état hydrique du sol et la transpiration a été construit et validé. Un module de prévision de la température au niveau des apex utilisant un bilan d'énergie a été développé. Ce modèle est extrapolable à tous les organes de la plante.

Par ailleurs, le nombre de graines par plante est réduit sous l'effet de conditions stressantes, hydriques ou thermiques, au travers i) d'une réduction du nombre de phytomères, due à l'inhibition précoce du développement des phytomères situés dans l'extrémité apicale (contraintes précoces) et ii) d'une modification de la répartition du nombre de graines sur la tige. Une contrainte thermique sévère provoque des avortements floraux. Une contrainte modérée tardive, hydrique ou thermique, favorise le développement de graines sur les premiers nœuds reproducteurs, sans modifier le nombre de graines par plante.

- **Amélioration de la résistance au gel du pois**

La génétique classique a permis d'améliorer partiellement le niveau de résistance au gel, mais n'a pas entraîné de véritable développement des surfaces de pois d'hiver. Il est dès lors devenu nécessaire de "décortiquer" le fonctionnement de la résistance afin d'être capable de cumuler tous les caractères intéressants, c'est-à-dire :

- ✓ la possibilité de maintien de la plante à l'état végétatif, car le passage de l'apex à l'état reproducteur accentue la sensibilité au gel,
- ✓ la résistance au gel à l'état végétatif, qui est en relation étroite avec la capacité d'endurcissement.

Maintien à l'état végétatif : le maintien à l'état végétatif pendant la période hivernale est une des caractéristiques des pois fourragers résistants au gel utilisés comme géniteurs dans les programmes de création variétale de pois d'hiver. Chez le pois, la génétique du passage à l'état reproducteur est bien connue.

En s'appuyant sur cette base bibliographique, des résultats récents donnent une évaluation de la variabilité génétique de la durée de la phase végétative en interaction avec les conditions environnementales. En fonction de la durée du jour au moment de l'initiation florale, des comportements variétaux bien différenciés ont été mis en évidence :

- ✓ la photopériode a un effet quantitatif sur les pois de printemps et la plupart des variétés d'hiver étudiées : le temps nécessaire pour le passage à l'initiation florale diminue lorsque la durée du jour augmente, avec une amplitude variable selon le génotype ;
- ✓ à l'inverse, les pois fourragers étudiés montrent une réaction qualitative à la photopériode : une durée du jour minimale est nécessaire pour le passage à l'initiation florale.

Par ailleurs la variabilité des variétés étudiées pour leur précocité intrinsèque (durée minimale entre la levée et l'initiation florale, observée en conditions de jours longs) a été quantifiée.

La relation entre ces deux caractères (type de réaction à la photopériode, précocité intrinsèque) et les allèles présents pour 2 loci majeurs de floraison (respectivement *Hr*, et *Lf*) a été établie. Ces résultats débouchent sur des perspectives originales pour la création de géniteurs de pois d'hiver, en donnant aux sélectionneurs les moyens de fabriquer des génotypes associant *Hr* pour retarder l'initiation florale et *Lf* pour garder une précocité de floraison compatible avec les impératifs agronomiques du pois protéagineux en Europe. Le marquage moléculaire des allèles intéressants est en cours.

## ◆ **Recherches en cours**

### • *Modélisation de l'impact des fortes températures et des contraintes hydriques*

Effet des contraintes environnementales sur la croissance : les recherches en cours à l'INRA portent essentiellement sur la spatialisation des modules développés au cours des années précédentes à l'aide de maquettes 3D (en collaboration avec le CIRAD AMAP) pour le bilan radiatif et le bilan d'énergie afin de construire des plantes virtuelles en interaction avec leur environnement pour la température et le rayonnement ; ainsi l'efficacité d'interception du rayonnement pourra être reconstruite à partir de modèles de développement intégrant les bilans radiatifs et d'énergie.

Au niveau international, les recherches en cours portent essentiellement sur le soja (USA), le haricot, le pois chiche et le lupin blanc (Australie), et aucune recherche importante ne porte sur le pois. Ces recherches peuvent être regroupées en deux champs disciplinaires très éloignés :

- ✓ des recherches très fines d'identification des mécanismes physiologiques lorsque les plantes sont soumises à des stress. En particulier le CLIMA (Australie) identifie et quantifie les variations génotypiques de ces caractères afin de construire une collection de géniteurs intéressants pour les sélectionneurs ;
- ✓ à l'autre extrême, des recherches très intégrées visent à identifier les contraintes environnementales, génétiques, mais aussi des systèmes de culture limitant l'adaptation et la production de légumineuses à graines dans des milieux stressants (environnement de type méditerranéen). Outre les recherches du CLIMA (Australie), de multiples équipes abordent ces aspects dans le monde (ICARDA, ICRISAT, Instituts de recherche du Maghreb, ...).

Cas de la nutrition azotée : la contrainte hydrique peut pénaliser le rendement des légumineuses de printemps en fin de cycle en agissant sur le prélèvement des ressources azotées. L'activité de la fixation symbiotique est en effet très sensible au stress thermique et le développement racinaire est souvent insuffisant pour l'exploration profonde nécessaire à la captation des ressources hydriques en fin de cycle. Les équipes de l'INRA disposent d'une variabilité génétique originale (mutants de pois, plante modèle *Medicago truncatula*) dont la caractérisation fonctionnelle est réalisée à l'aide de modèles écophysologiques. Ces équipes travaillent sur l'acquisition de connaissances concernant le déterminisme du développement et de l'activité de prélèvement des ressources du système racinaire, en rapport avec les contraintes environnementales (température du sol et disponibilité en nitrate).

### • *Amélioration de la résistance au gel du pois*

Maintien à l'état végétatif : l'objectif du travail en cours est de déterminer des marqueurs moléculaires associés aux allèles Lf/Lfd et Hr/hr, utilisables de façon précoce en sélection à partir d'une population de lignées recombinantes issue du croisement Champagne (géniteur largement utilisé en Europe pour la sélection de pois d'hiver, résistant au gel, Lfd, Hr) x Tèrese (parent de la cartographie française de référence, sensible au gel, Lf, hr).

Résistance au gel à l'état végétatif : la capacité d'endurcissement de la plante, en relation avec les conditions photothermiques qui précèdent le gel est un autre aspect fondamental de la résistance au gel ; de nombreuses observations ont en effet montré qu'il existe aussi de la variabilité génétique pour la résistance au gel avant le passage à l'état reproducteur. Cet aspect nécessite de définir des critères physiologiques pertinents de caractérisation de l'endurcissement.

Sur le plan international, les équipes australiennes (Université de Tasmanie, Université du Queensland) s'impliquent maintenant plus fortement dans la compréhension des mécanismes physiologiques qui régissent le développement et l'architecture du pois : les projets en cours ont trait également à la génétique, à la biologie moléculaire et à la biochimie de mutants

contrôlant la floraison, les phytochromes, la synthèse et la réponse aux gibbérellines, l'élongation des entre-nœuds et le développement de la graine. Le John Innes Centre (UK) développe plusieurs projets sur le pois (base internationale de ressources génétiques, organisation du génome du pois, génétique de la réponse aux stress oxydatifs), qui s'avèrent déjà, ou peuvent s'avérer complémentaires du projet français sur l'amélioration de la résistance au gel du pois. Enfin, l'Université de Valence travaille sur l'ontogénèse des fleurs de pois (intérêt notamment pour les mutants d'"identité florale des méristèmes").

#### ♦ **Commentaires et perspectives**

- *Modélisation de l'impact des fortes températures et des contraintes hydriques*

*Au niveau international, les recherches portent sur d'autres espèces de légumineuses que le pois et surtout abordent les problèmes posés par des stress thermiques ou hydriques soit de façon très fine ou soit sous une forme très intégrée, avec des travaux qui s'apparentent aux expérimentations menées par les instituts techniques français. L'échelle d'étude intermédiaire à laquelle se place la recherche française sur le pois est très peu, voire pas, représentée dans le monde.*

- *Amélioration de la résistance au gel du pois*

Les travaux de génétique sur le maintien à l'état végétatif constituent une application originale des recherches effectuées depuis 30 ans sur la génétique de la floraison chez le pois (Université de Tasmanie) : ils ont pour *objectif d'étendre la zone de culture du pois d'hiver dans les conditions climatiques fraîches et humides du nord-ouest de l'Europe et les études concernent à la fois le passage à l'initiation florale et la floraison.*

Sur le plan international, les travaux cités ci-dessus, ainsi que les recherches effectuées au John Innes Centre (UK) sur le déterminisme génétique de la floraison chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* serviront notamment de base à la recherche et à la cartographie de gènes candidats, dans les populations étudiées dans les projets pois du programme Génoplante.

#### ♦ **Références bibliographiques**

- ✓ Laucou V., Haurogné K., Ellis N. Rameau C., 1998. Genetic mapping in pea 1. RAPD-based genetic linkage map of *Pisum sativum*. Theor Appl Genet., 97 : 905-915.
- ✓ Weller J.L., Reid J.B., Taylor S.A., Murfet I.C., 1997. The genetic control of flowering in pea. Trends in Plant Science.

#### ♦ **Adresses des laboratoires connus**

- *Etranger*

- ✓ John Innes Centre, UK (Ellis)
- ✓ Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Université de Valence, Espagne (Beltran)
- ✓ Université de Tasmanie, Australie (J.B. Reid)
- ✓ Université du Queensland, Australie (Beveridge)
- ✓ Australian National University, Australie (Chandler)
- ✓ CLIMA, Australia (N.C. Turner)
- ✓ USDA Gainesville, Floride, USA (T.R. Sinclair)

- *France*

- ✓ INRA, Agro Montpellier, LEPSE
- ✓ INRA GAP Mons

## Conclusion sur l'élaboration du rendement

Les travaux concernant le fonctionnement de la plante sont pour partie synthétisés dans des modèles à différents niveaux d'opérationnalité. Il existe dans la recherche internationale un réseau de laboratoires réunis autour de CROPGRO, logiciel simulant la croissance, le développement et le rendement en fonction du sol, du climat ainsi que des pratiques agricoles. CROPGRO regroupe des modèles sur différentes espèces dont certaines légumineuses (soja, pois chiche, haricot, arachide). A terme ces modèles sont destinés à faciliter le transfert de connaissances « agrotechnologiques ».

Les travaux réalisés par la recherche française ne sont actuellement pas intégrés dans ce réseau pour diverses raisons :

- ✓ l'approche française, tant en terme de phénologie (modèles séquentiels) que de simulation de la croissance (modélisation de la surface foliaire et de la conversion du rayonnement sans module de photosynthèse), ne s'intègre pas forcément dans les schémas choisis pour ces grands modèles. Une partie des travaux français sont synthétisés dans un système de gestion de modèles biologiques standard pour tous les cultures (STICS<sup>®</sup> INRA) : le paramétrage est en cours pour le pois et le soja.
- ✓ les différences d'approche découlent d'objectifs différents : dans l'approche française, la modélisation est avant tout utilisée pour la formalisation des idées et n'est pas un objectif en soi. L'effort de modélisation permet d'une part de définir des voies de recherches, de raisonner la caractérisation génotypiques pour les généticiens et les sélectionneurs, et d'autre part de transférer pour partie de la façon la plus intégrée possible les connaissances vers les organismes de développement.

Les modalités actuelles de paiement des protéagineux et leur place difficile à tenir entre céréales et soja, font que *l'objectif d'augmentation du potentiel de rendement reste toujours d'actualité*. Ainsi les surfaces emblavées en pois ont été très fortement réduites au cours des dernières années du fait de la baisse du prix non compensée par une augmentation de rendement. Dans ce cadre les perspectives d'amélioration du rendement doivent être analysées afin de dégager les limites et les marges de progrès :

- ✓ en ce qui concerne le carbone, les travaux déjà réalisé en agronomie ont montré que *dans les conditions de semis actuellement pratiquées, le potentiel de croissance de croissance est souvent atteint et par conséquent une modification des pratiques culturales en l'absence de facteurs limitants serait probablement suivie de peu d'effets sur le rendement*. En revanche il existe une variabilité génétique pour l'acquisition du carbone (en particulier pour l'efficacité de conversion du rayonnement en matière sèche) ; *la recherche de génotypes à haute performance pour l'acquisition du carbone pourrait éventuellement permettre d'augmenter le potentiel de rendement ;*
- ✓ en ce qui concerne l'azote, des travaux récents ont montré pour le pois une *bonne complémentarité entre assimilation et fixation*, et ce jusqu'en fin de cycle, en conditions potentielles. Par conséquent, *l'amélioration génétique de la prospection racinaire, de l'efficacité de prélèvement de l'azote, ..., pourra améliorer sensiblement la nutrition azotée du pois qui limite le rendement et sa qualité protéique*. Cependant l'approche génétique de voies aussi complexes (interactions entre différentes voies métaboliques du carbone et de l'azote, effet des conditions environnementales, ...) ne peut être pertinente que si elle s'appuie sur des critères écophysiologiques objectifs définis à partir de la connaissance des mécanismes impliqués. Or il est notable que si la connaissance des chaînes métaboliques est bonne, les physiologistes disposent actuellement de peu de connaissances sur les mécanismes de régulation de ces chaînes.

Par ailleurs, *le développement des recherches pluridisciplinaires (agronomes, pathologistes, généticiens) sur l'effet de conditions environnementales et l'interaction entre génotype et environnement devrait permettre d'envisager une réduction du niveau d'intrants dans les cultures protéagineuses sans perte trop importante de rendement, tout en en conservant la stabilité.*

◆ **Sites internet consultés**

<http://agrss.sherman.hawaii.edu/dssat/general/info.htm>

<http://www.clima.uwa.edu.au>

<http://www.cgiar.org/icrisat/>

### 3.3 Les Contraintes biotiques (parasites et ravageurs)

#### Introduction

Les protéagineux (pois, féverole, pois chiche, lupin, lentille, ...) sont soumis pendant toute leur période de culture à un ensemble de contraintes biotiques qui occasionnent des pertes plus ou moins importantes de rendement : des parasites et des ravageurs, mais également des végétaux parasites.

Ces contraintes biotiques, générales à l'ensemble des protéagineux, peuvent se répartir en 5 classes (Hebblethwaite, 1983; Hebblethwaite *et al.*, 1985) :

- les maladies cryptogamiques aériennes : les Botrytis, l'Anthracnose, le Mildiou, la Rouille ;
- les problèmes parasitaires telluriques (*Pythium*, *Fusarium*, ...)
- les maladies virales transmises ou non par les semences ;
- les ennemis des cultures : Nématodes, Pucerons et Sitones ;
- l'Orobanche (plante parasite).

Néanmoins, certaines maladies sont spécifiques de telle ou telle espèce et leur répartition dépend des zones de culture. C'est par exemple le cas de l'Aphanomyces ou de la Bactériose sur pois.

Les études poursuivies recouvrent tous les domaines de la protection des plantes : diagnostic, études populationnelles, épidémiologie, méthodes de lutte (dont la transgénèse et la résistance variétale). **En ce qui concerne le présent rapport, nous nous limiterons à deux espèces importantes : le pois et la féverole**, sachant qu'en France les recherches sont exclusivement menées sur le pois. Nous partirons des recherches qui sont effectuées en France, en mettant l'accent sur les démarches et les acquis, ce qui permettra de situer ces recherches par rapport aux autres recherches effectuées en Europe et dans le monde.

Tout comme les autres grandes filières de production, les protéagineux sont soumis à un cahier des charges dont l'objectif est de développer une agriculture durable, soucieuse de l'environnement et moins coûteuse.

C'est dans ce contexte que sont développés en France, quatre axes clé stratégiques :

- l'identification des bioagresseurs et l'étiologie des problèmes sanitaires (c'est à dire l'études des causes) ;
- la résistance en lien avec la diversité des populations de bioagresseurs ;
- la génétique des résistances partielles ;
- le développement épidémique et la nuisibilité.

#### IDENTIFICATION DES BIOAGRESSEURS ET ETIOLOGIE DES MALADIES

Cette thématique présente un double intérêt :

- ✓ le pois est une culture jeune chez laquelle les problèmes sanitaires n'ont pas tous été décrits (virus, évolution des maladies fongiques) ;
- ✓ il s'agit également d'une culture intervenant dans des systèmes de culture en constante évolution, ce qui conduit soit à l'apparition de problèmes nouveaux, soit à des comportements spécifiques de tel ou tel bioagresseur.

### ◆ **Enjeux**

*Il s'agit principalement d'orienter les stratégies de lutte en développant les outils d'évaluation de l'état sanitaire des cultures d'une part, en identifiant et en caractérisant les bioagresseurs d'autre part.* Cela implique de :

1. maintenir et renforcer un haut niveau d'expertise en matière de diagnostic des maladies des plantes cultivées et de caractérisation des agents pathogènes et des ravageurs.

2. pouvoir intervenir :

a) rapidement, en préconisant des mesures thérapeutiques, en particulier dans le domaine de la sélection sanitaire et de la prévention des risques ;

b) dans la durée, en orientant les programmes de recherche sur l'épidémiologie, les résistances génétiques, la lutte intégrée.

En France, ces recherches portent principalement sur l'ensemble des maladies cryptogamiques et virales, ainsi que sur le puceron du pois. Elles ont comme principaux objectifs scientifiques :

1. d'identifier et de caractériser les populations de bioagresseurs en précisant leur nuisibilité, leur biologie et leur variabilité, avec des prolongements éventuels dans le domaine de la taxonomie ;

2. d'améliorer, au besoin de créer, les outils de détection de façon à les rendre hautement sensibles, spécifiques, fiables et utilisables à grande échelle.

### ◆ **Résultats acquis par la recherche**

#### • *Identification et caractérisation des populations de bioagresseurs*

En ce qui concerne les aphides, dans le cadre de travaux sur la variabilité des populations du puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* sur la luzerne, et avec la collaboration de J.C. Simon du Rheu, des marqueurs (allozymes) ont été trouvés. Ils ont été appliqués par S. Carré (Lusignan) en 1998 sur des populations de ce puceron se trouvant sur des légumineuses pérennes (dont la luzerne) et sur des légumineuses annuelles (dont le pois et la féverole) afin d'estimer la diversité génétique de ces populations. Des différences très marquées ont été trouvées notamment entre des populations sympatriques de la luzerne et du pois en conditions agronomiques. Les analyses complémentaires réalisées par J.C. Simon sur ces échantillons ont confirmé ces distinctions avec des marqueurs microsatellites. Le modèle *A. pisum* est donc particulièrement intéressant pour l'étude des races d'hôtes des aphides, qui existent de façon sympatrique en France. Ces différences pourraient relever des organismes endosymbiotiques hébergés par les pucerons, dont les marqueurs moléculaires sont étudiés à Rennes et dont le rôle métabolique dans la nutrition des aphides sera étudié à l'INSA de Villeurbanne.

Des enquêtes sont régulièrement organisées pour réaliser le suivi des maladies virales et cryptogamiques. Des résultats significatifs sont obtenus, montrant d'une part, la prédominance des deux virus (le pea enation mosaic virus et le pea seed borne mosaic virus) et d'autre part, l'extension dans les zones de production de certains problèmes cryptogamiques (*Aphanomyces*, *Oïdium*, Rouille). En revanche, ces mêmes observatoires montrent la stabilisation, à un niveau élevé, de l'Anthracnose, du Botrytis et du Mildiou. Par ailleurs, une enquête annuelle (INRA, SPV, AMSOL) sur 300 parcelles a pour objectif de suivre l'évolution des principaux ravageurs du Pois protéagineux.

#### • *Conditions de développement et de conservation, et biologie des bioagresseurs*

Il s'agit de préciser comment la nature de la rotation peut modifier quantitativement et/ou qualitativement les populations de bioagresseurs. Le travail porte principalement sur les populations d'*A. euteiches*. Il consiste à déterminer d'une part, s'il existe des plantes de coupure (moutarde, avoine, phacélie) susceptibles de diminuer le potentiel infectieux du sol et d'autre part, s'il existe un risque de passage de la maladie sur des légumineuses autres que le pois (féverole, lupin, haricot). Cette étude a nécessité plusieurs mises au point méthodologiques concernant la technique d'inoculation, l'estimation du potentiel infectieux des sols et le choix des critères d'appréciation de la maladie. Les premiers essais en conditions sont actuellement en cours de réalisation. Par ailleurs, la différenciation de races d'hôtes adaptées à des légumineuses pérennes ou annuelles implique dans le cas du puceron *A. pisum*, la recherche des plantes d'origine des aphides en fonction des spécialisations alimentaires sur les genres *Pisum*, *Medicago*, *Vicia*.

Dans ce cadre-là, des travaux récemment terminés, réalisés par l'équipe Dijonnaise de E. Dumas-Gaudot, visaient à étudier l'interaction entre les mycorhizes (genre *Glomus*) et le développement d'*A. euteiches*. Il ressort

que la symbiose mycorhizienne doit être bien établie, avec présence d'arbuscules, pour que la bioprotection s'exprime, ce qui limite les chances d'efficacité dans la pratique. Il a été montré, par test ELISA, que la bioprotection s'accompagne d'une réduction de la colonisation racinaire par *A. euteiches*. L'hypothèse du rôle d'activités chitinasés et chitosanase reliées à la mycorhization dans la bioprotection est avancée mais reste à démontrer (programme actuellement en veille).

- **Amélioration et/ou création d'outils performants de caractérisation et de détection**

Cet aspect qui est peu développé, est la conséquence logique des études d'identification et de caractérisation des bioagresseurs. Le travail le plus conséquent a été l'obtention d'outils de détection des principaux virus du Pois. Dans le cas d'*A. euteiches*, un anticorps polyclonal développé par S. Rosendahl (Université Royale de Copenhague), permet en effet de quantifier le pathogène dans les racines. Cet outil a été notamment utilisé par S. Slezack lors de sa thèse (INRA Dijon).

- ◆ **Recherches en cours**

Cette thématique est assez développée au niveau international en particulier pour les pucerons, avec des approches phylogéniques appuyées par marqueurs (Canada, UK), comportementales sur les conditions d'acceptation ou de rejet de la plante (USA), et évolutives pour la spéciation sympatrique (USA).

Nous bénéficions en France de marqueurs de variabilité plus intéressants que nos collègues anglais ou canadiens et nous faisons l'effort de situer la composition des populations en conditions agronomiques dans le temps (saison) et dans l'espace (zone géographique), alors que nos collègues utilisent quelques clones pour faire leurs études sans toujours savoir leur importance aux plans agronomique et populationnel.

En ce qui concerne les parasites, cette thématique est particulièrement développée dans les centres internationaux de recherche (ICARDA et ICRISAT) lors des études sur la protection intégrée (Integrated Disease Management). Aux USA, l'équipe de V.A. Fritz (Université du Minnesota), met en évidence le rôle des cultures d'Avoine et de Crucifères sur la réduction de *Aphanomyces*. L'équipe de J. Parke (USA) réalise des travaux sur l'utilisation des *Pseudomonas* antagonistes. Dans le cas des virus, des compétences existent au Royaume-Uni, au Danemark, en Espagne et en Allemagne ainsi qu'à l'ICARDA.

- ◆ **Commentaires et perspectives**

En France, ces études sont en général menées avec la profession ; elles permettent d'identifier et de faire émerger de nouveaux sujets de recherche, sur des problèmes parasitaires en constante évolution. Pour illustrer ce propos, deux exemples sont particulièrement significatifs : c'est à partir des visites réalisées lors des inventaires sur les maladies fongiques aériennes que la thématique "Epidémiologie et nuisibilité" de l'antracnose est apparue; par ailleurs, ce sont également ces visites qui ont permis de mettre en évidence les problèmes potentiels de la Fusariose et la nécessité d'engager un programme de recherche sur cette maladie. De plus, ces études confèrent aux équipes impliquées dans ce type d'approche, une expertise et un savoir-faire sur les problèmes sanitaires de la filière, reconnus de tous.

**Les études en cours et futures visent à préciser le rôle du système de culture sur l'évolution des populations ainsi que sur la spécificité d'hôte**, que ce soit au niveau parasitaire (*Aphanomyces*) ou de la spécialisation alimentaire (Pucerons). Elles permettront d'obtenir à la fois, des outils de diagnostic et les bases pour une meilleure pratique des rotations.

## POPULATIONS DE BIOAGRESSEURS ET GESTION DES RESISTANCES

### ◆ **Enjeux**

*Cette thématique contribue aux conditions de développement d'une agriculture durable, basée à la fois sur la création de nouvelles variétés, leur utilisation raisonnée, et la réduction des traitements phytosanitaires.* Cela nécessite :

1. d'exploiter la diversité des sources de résistance variétales en fonction des caractéristiques évolutives des populations de bioagresseurs visées ;
2. de valider de nouvelles stratégies d'utilisation des génotypes.

Cette thématique recouvre les grands problèmes sanitaires de la culture de pois : l'Anthracnose et l'Aphanomyces, les Pucerons et également les nématodes de la féverole.

### ◆ **Résultats acquis par la recherche**

Les recherches sur ce thème se déclinent autour de trois objectifs principaux :

1. décrire et analyser la biologie et la génétique des populations de bioagresseurs ;
2. améliorer la méthodologie d'identification et de caractérisation des sources de résistance et des génotypes ;
3. évaluer la durabilité des résistances en relation avec la stratégie de gestion mise en œuvre.

Les résultats concernent des modèles d'étude assez différents les uns des autres et le choix du modèle relève souvent d'une nécessité agronomique ou d'une demande internationale.

#### • **Caractérisation des populations de bioagresseurs**

De très nombreuses études sont réalisées dans ce domaine.

Dans le cas d'*A. euteiches*, les populations européennes (essentiellement françaises) testées possèdent une spécificité d'hôte bien moins définie que certains isolats américains ou australiens. Les isolats français, bien que préférentiellement pathogènes sur pois, sont capables d'attaquer 2 à 3 autres espèces (vesce, luzerne, féverole, haricot). Par ailleurs, une gamme d'hôtes différentiels a été mise au point par E. Wicker grâce à une collaboration menée avec J. Kraft (USDA Prosser) et Gritton (Université de Wisconsin-Madison), C. Simon (USDA Pullman) et M. Duparque (GSP, Mons). L'étude de virulence entreprise sur cette gamme a permis de montrer qu'il n'existe pas à ce jour de différence de virulence parmi les souches françaises, mais plutôt des groupes d'agressivité. En revanche, ces mêmes souches sont virulentes sur un génotype (MN 313) résistant à la majorité des isolats Nord-Américains.

En ce qui concerne *M. pinodes*, l'étude de 50 souches françaises montre une faible variabilité, tant en ce qui concerne les critères physiologiques, pathogéniques, que moléculaires. L'analyse RAPD permet de distinguer clairement *M. pinodes* de *Phoma medicaginis* var *pinodella*, qui ont chacun une faible variabilité intraspécifique. Bien que les deux espèces produisent des symptômes identiques, ils peuvent être distingués par leur période d'incubation et leur agressivité respectivement plus courte et plus forte chez *M. pinodes*. Il a été mis en évidence chez des génotypes peu adaptés agronomiquement issus de collections étrangères et de sélection réalisée antérieurement par R. Cousin à Versailles, des niveaux intéressants de résistance partielle. Les tests de virulence ne permettent pas de démontrer l'existence de pathotypes au sein des isolats de *M. pinodes*. Pour ce parasite, comme pour *A. euteiches*, les collaborations développées avec nos collègues du DGAP de Rennes (A. Baranger, J. Le Guen) et avec le Groupement des Sélectionneurs de Pois (GSP), permettent de diversifier les gammes d'hôtes différentiels et d'augmenter les sources de résistance.

En ce qui concerne la bactériose (*Pseudomonas syringae* pv *pisi*), les études ont permis de dresser un inventaire des races présentes en France (présence essentiellement de la race 2), d'étudier la relation entre distribution des races observée et résistances présentes, et de réaliser une caractérisation moléculaire des races par amplification des gènes d'avirulence. Par ailleurs, il a été fait une première mise en évidence d'une résistance à la race 6 (collaboration J.D.Taylor HRI Wellesbourne, R. Cousin INRA Génétique et Amélioration des Plantes, Versailles, dans le cadre d'un programme européen) dans l'espèce ancestrale *Pisum abyssinicum*. Enfin, l'analyse génétique de cette résistance et des autres résistances présentes chez le pois (collaboration R. Cousin INRA Versailles) a pu être entreprise : à côté de résistances dominantes déjà connues et présentes dans des cultivars commerciaux, d'autres résistances, notamment à la race 4, ont été identifiées chez *Pisum abyssinicum* où elles sont cumulées avec la résistance monogénique récessive à la race 6. Introduction de la résistance à la race 6 dans des cultivars de pois protéagineux de valeur agronomique (collaboration R. Cousin INRA Versailles).

Enfin, dans le cas du nématode des tiges de la Féverole (*Dirtylenchus dipsaci*), les principaux résultats concernent la mise en évidence de sources de résistance et de pathotypes de la race géante, capables de contourner la résistance d'un génotype de résistance 29H (collaboration J. Le Guen, DGAP Rennes). L'étude biologique du

polymorphisme chez le nématode est confortée par l'étude du protéome (électrophorèse bi-dimensionnelle, avec M. Bossis) et l'utilisation de marqueurs biomoléculaires RAPD et autres (DALP et AFLP). Des études sont en cours pour approfondir cette caractérisation interspécifique méditerranéennes.

- **Composantes de la résistance partielle**

Cet aspect est essentiel pour les deux pathosystèmes principalement étudiés : Anthracnose et *Aphanomyces* (Baranger et Tivoli, 1998). En effet, il n'existe pas de résistance totale vis à vis des différents parasites occasionnant ces maladies et une démarche spécifique originale a été amorcée vis à vis de la résistance partielle. Les études reposent sur des données épidémiologiques puisque les composantes étudiées concernent les phases du cycle parasitaire : incubation, extension des symptômes, latence, fructification. Pour chacun des cas, le travail en est à son début. Lors des tests préliminaires, il est apparu que sur les génotypes les plus résistants à *Aphanomyces*, les symptômes racinaires évoluent plus lentement que sur les génotypes sensibles, ce qui se traduit par des pertes plus faibles de poids frais des parties aériennes des plantes.

- **Mise au point de test d'évaluation du comportement variétal**

Ces tests d'évaluation du comportement variétal sont mis au point au sein des équipes du Département SPE, pour être ensuite transférés dans les équipes du DGAP. Cet aspect constitue le point commun de tous les modèles étudiés. Un test d'évaluation en conditions contrôlées du comportement variétal du pois vis-à-vis d'*A. euteiches* a été conçu à la demande des sélectionneurs. La mise au point de ce test s'est déroulée en plusieurs étapes. La première consistait à produire un inoculum stable au cours du temps en viabilité et en infectivité. La deuxième étape avait pour but de définir les conditions de déroulement du test (substrat, température, humidité, méthode d'inoculation et de notation). Enfin, il était nécessaire de déterminer des génotypes de référence ainsi que des souches représentatives.

Les criblages peuvent être réalisés en serre (19-24°C) ou en chambre climatique (23-25°C), la durée du test étant de 240 degrés-jours. Ce test de criblage s'est révélé fonctionnel et adapté aux sélectionneurs : simple et rapide, il permet de discriminer de façon reproductible un grand nombre de lignées. Les résultats obtenus par le test ont été comparés aux résultats obtenus en conditions naturelles en 1999 pour une gamme de 6 génotypes. Les Indices de nécroses racinaires (INR) obtenus par le test sont corrélés aux INR ( $R^2=0.62$ ) et indices foliaires ( $R^2=0.82$ ) obtenus en conditions naturelles. Ce test a été transféré aux sélectionneurs; les premiers criblages ont commencé en janvier 2000. Aucun des génotypes de pois considérés comme résistants aux USA ne donne satisfaction en France.

Dans le cas de *M. pinodes*, des tests en chambre climatique sur plantes possédant 4-6 étages (stade juvénile) et des tests sur stipules détachés maintenus en survie ont été mis au point. Ils permettent d'apprécier les niveaux de résistance intrinsèque de résistance partielle et d'analyser les composantes de la résistance partielle des différents génotypes.

Pour *D. dipsaci*, des tests d'évaluation ont été mis au point et sont disponibles pour apprécier la résistance des protéagineux (*Vicia*, *Pisum*). Ces tests réalisés en conditions contrôlées, sont basés sur la gravité des symptômes ainsi que sur le taux de multiplication du nématode dans les plantes. Les résultats mettent en évidence l'existence de lignées de pois tolérantes (Australie), et de féveroles résistantes (dont la lignée INRA, 29H).

- ◆ **Recherches en cours**

Cette thématique est travaillée sur *M. pinodes* par des équipes importantes en Australie (M. Ramsey au SARDI, T. Khan au Département d'Agriculture d'Australie occidentale, ou J. Brouwer à VIDA), et au Canada (A. Xue, Manitoba). Dans le cas d'*A. euteiches*, l'Université de Copenhague (S. Rosendhal) maîtrise les outils de caractérisation moléculaire des populations (contact avec la Pathologie de Rennes), ainsi qu'aux USA (Georges Vandemark, USDA Prosser et CR. Grau, Université du Wisconsin). C'est aux USA que les travaux de sélection pour la résistance sont les plus avancés en raison de l'antériorité de la prise en charge de ce problème (USDA Prosser, J. Kraft et USDA Pullman, C. Coyne et F. Muehlbauer).

### ◆ **Commentaires et perspectives**

Au niveau de ce chapitre, il convient d'évoquer la démarche "*Medicago truncatula*", qui est à la fois du domaine de l'actualité et de celui de la prospective.

L'introduction de *Medicago* annuelles et diploïdes dans ce programme doit permettre de tirer parti des travaux des biologistes moléculaires qui réalisent des recherches sur la génomique fonctionnelle de ces légumineuses. Leur présentation actuelle attire l'attention sur les synténies existant entre les cartes génétiques de *M. Truncatula*, de la luzerne et du pois. Des résultats préliminaires acquis par l'Unité de Zoologie de Lusignan montrent la résistance très élevée d'un cultivar de *M. tornata* vis-à-vis du puceron *A. pisum*. Ce fait est à rapprocher des résultats australiens acquis sur la résistance monogénique de diverses espèces diploïdes de *Medicago* à d'autres espèces de pucerons (*A. kondoi* et *Therioaphis trifolii*). Pour l'Unité de Zoologie de Lusignan, le programme à réaliser concerne la mise au point de la méthodologie d'évaluation de la résistance variétale de *M. truncatula* au puceron du pois, selon une méthode fiable et reproductible, et de confronter les résistances observées à la variabilité des populations du puceron du pois, avant d'envisager tout criblage de lignées. Dans un avenir proche, cette Station doit proposer une collection core à tester vis-à-vis de divers parasites (agents d'Anthracnose et d'Aphanomyces) et ravageurs (Pucerons et Nématodes).

Il est bien évident que dans la mesure où seules des sources de résistance partielles sont disponibles, les études de génomique sont de première importance. Le récent séminaire sur *M. truncatula* organisé par le CNRS et l'Association Européenne pour la Recherche sur les Protéagineux (AEP), les 16 et 17 décembre 1999 à Gif sur Yvette, a montré l'investissement des différentes équipes françaises (J. Denarié à Toulouse, P. Ratet au CNRS de Gif sur Yvette, J.M. Prospéri au DGAP de Montpellier) et étrangères (N. Ellis au John Innes Center à Norwich, D. Cook Texas University aux USA) dans ce domaine. Après avoir abordé l'état de l'art en ce qui concerne *M. truncatula*, il s'agissait de préciser les demandes au niveau des légumineuses alimentaires puis de voir comment transférer aux espèces cultivées, les connaissances et les techniques acquises sur cette espèce modèle.

La collaboration déjà effective du Pôle rennais (SPE, GAP) avec ces équipes devrait logiquement se développer au cours des prochaines années.

Ces études viendront conforter celles réalisées sur la résistance partielle, ce qui conduira à des résultats rapidement utilisables par la Génétique et l'Amélioration des Plantes.

## GENETIQUE DES RESISTANCES PARTIELLES

L'organisation en réseau des laboratoires du groupe protéagineux du DGAP conduit au fait que la résistance aux stress abiotiques est étudiée à Mons, les aspects de qualité de la graine sont entrepris à Dijon, alors que les études génétiques liées à l'architecture de la plante ainsi que les aspects clonage et transformation sont entrepris à Versailles. Les études de résistance génétique aux pathogènes sont menées dans le laboratoire « Pois protéagineux » de l'UMR d'amélioration des plantes et de biotechnologies végétales de Rennes, en collaboration avec les laboratoires SPE de Rennes concernés par les protéagineux.

Malgré les recherches importantes réalisées dans de larges collections en France, aux USA et en Australie en particulier, il a jusqu'à présent été impossible de mettre en évidence une résistance totale à l'anthracnose ou à Aphanomyces. Cependant, certains génotypes montrent

un comportement de résistance partielle à l'un ou l'autre de ces champignons pathogènes, se traduisant par un ralentissement du cycle de développement du parasite.

#### ◆ **Enjeux**

*Cette recherche de résistances génétiques s'inscrit dans une démarche globale d'agriculture durable, moins dépendante des intrants et plus respectueuse de l'environnement.* Elle a également pour objectif de limiter les charges de production et d'assurer une stabilisation des rendements afin d'accroître la compétitivité de l'agriculture nationale. Par ailleurs, le développement de la culture du pois dans certaines régions françaises est étroitement lié à la mise en place de stratégies de lutte, parmi lesquelles l'implantation de variétés génétiquement résistantes.

*Au plan cognitif, les études menées sont susceptibles d'aider à comprendre les conditions de l'expression de la résistance partielle* (interactions avec l'environnement, confrontation stade de développement du pathogène x stade de la plante), à mieux comprendre les spécificités des résistances quantitatives et leur lien possible avec des résistances qualitatives, et à appréhender les mécanismes intervenant dans l'expression de la résistance. L'approche quantitative des résistances partielles est un objectif de recherche prioritaire à la station d'amélioration des plantes de Rennes, et les modèles (aérien et racinaire) étudiés chez le pois trouvent un parallèle chez les autres espèces travaillées à la station (blé, crucifères).

Les études portent sur deux pathosystèmes (Anthracnose / pois et Aphanomyces / pois), qui permettent d'envisager – en particulier dans le cadre d'une approche de génomique fonctionnelle – l'analyse comparée des déterminants génétiques d'une résistance quantitative à un parasite aérien et à un parasite tellurique.

*Les objectifs scientifiques de ces recherches peuvent se résumer par le items suivants :*

1. Analyser la variabilité génétique potentielle existant dans le domaine de la résistance ou de la tolérance à ces agents pathogènes ;
2. Identifier des variables détaillées ou synthétiques d'appréciation de la résistance ;
3. Identifier les déterminants génétiques des résistances quantitatives : localisation sur le génome, effets individuels et en interaction, spécificité en fonction des isolats, stabilité vis à vis des fonds génétiques et de l'environnement (année, lieu, conditions de réalisation des tests) ;
4. Déterminer les mécanismes sous-jacents aux modes d'action de ces gènes : stade de l'interaction où s'exprime la résistance (phase du cycle épidémiologique x stade de développement de la plante), fonctions enzymatiques et moléculaires putatives. En particulier l'étude de mécanismes communs aux interactions symbiotiques (avec les bactéries fixatrices d'azote et les mycorhizes) et aux interactions de résistance (notamment concernant le modèle racinaire) sera intéressante à analyser ;
5. Identifier et mettre à disposition des marqueurs moléculaires liés à ces déterminants génétiques et proposer des méthodologies d'utilisation dans le cadre de la sélection pour la création de géniteurs de résistance.

#### ◆ **Résultats acquis par la recherche**

##### • *Analyse des résistances partielles*

L'analyse d'une collection mondiale de pois a montré qu'il n'existe pas de résistance totale à *M. pinodes* mais qu'en fonction des génotypes on peut mettre en évidence des résistances partielles s'exprimant à des stades différents du développement des plantes et à des degrés divers d'expression. La situation concernant la résistance à Aphanomyces est comparable, bien que l'effort de criblage réalisé jusqu'à présent soit moindre.

D'une manière générale, les méthodes d'évaluation du comportement variétal sont proposées par les équipes de SPE, et sont élargies à des gammes génotypiques (collections, populations en ségrégation, matériel en sélection) dans le cadre du GAP. Elles visent à identifier les étapes du cycle d'infection qui sont effectivement ralenties

chez les génotypes partiellement résistants, en fonction du stade de développement de la plante (plantule, stade adulte) et par différentes méthodes d'évaluation (intensité des symptômes et hauteurs malades évaluées en conditions contrôlées ou au champ).

Pour l'antracnose, quatre types d'approches sont menées :

- ✓ la recherche de composantes de résistance partielle sur organes maintenus en survie est en cours d'étude en SPE (cf. "Les populations de bioagresseurs et gestion des résistances"). Les résultats de cette étude seront transférés à des gammes génotypiques plus larges à l'avenir;
- ✓ des variables de suivi de la cinétique de développement du parasite sur plantules ont été déterminées (conditions contrôlées);
- ✓ des variables de suivi de la cinétique de développement du parasite sur plante adulte seront proposées (conditions de champ);
- ✓ en collaboration avec le GSP, des variables synthétiques d'appréciation rapide du comportement dans des programmes de sélection ont été proposées.

Pour l'Aphanomyces, les 2 méthodes développées par les équipes de SPE (recherche de variables d'évaluation de la résistance au stade plantule d'une part, au stade adulte d'autre part) seront transférées prochainement au GAP.

#### • *Développement de cartes génétiques et colocalisation de QTLs de résistance*

L'identification des déterminants génétiques de la résistance partielle se fait à l'aide d'une ou plusieurs cartes génétiques établies par l'étude de populations de lignées recombinantes en ségrégation issues de croisements simples. Pour l'antracnose, quatre populations de lignées recombinantes F6 ségrégeant pour la résistance sont disponibles, l'une d'elles est en cours d'étude. Pour l'Aphanomyces, en collaboration avec l'USDA (Pullman), 2 populations de lignées recombinantes sont en cours d'étude.

Une carte génétique du pois est disponible à Versailles; elle comporte essentiellement des marqueurs RAPDs et quelques RFLPs qui ont permis de l'aligner avec la carte de Noël Ellis (John Innes Centre). Cette carte a notamment permis de localiser plusieurs mutations d'architecture (en particulier des gènes de ramification) sur le génome du pois. La création de nouvelles cartes destinées à identifier des gènes intervenant dans la résistance partielle doit prendre en compte l'existence de cette carte, et éventuellement d'autres cartes au niveau national (groupe DGAP) et international. Cela a une forte incidence sur le développement de marqueurs, et l'entrée prochaine du groupe protéagineux DGAP dans le consortium « microsattellites AGROGENE » va permettre de travailler sur des cartes consensus en utilisant une très large gamme de marqueurs microsattellites communs.

Les marqueurs sont choisis de manière :

- ✓ à pouvoir aligner les cartes : les marqueurs RAPD reproductibles ont été identifiés (35 locus), 40 marqueurs SSRs ont été développés à partir des séquences microsattellites repérées dans les gènes enregistrés dans les bases de données. L'entrée prochaine du groupe protéagineux DGAP dans le consortium microsattellites AGROGENE va nous permettre de travailler sur des cartes consensus en utilisant une très large gamme de marqueurs microsattellites communs (environ 200 SSRs);
- ✓ à pouvoir saturer les cartes : la technique AFLP est en cours de mise au point;
- ✓ à pouvoir attribuer une fonction putative aux QTLs identifiés par colocalisation avec des gènes de fonction connue : gènes de pois codant des enzymes intervenant dans les mécanismes généraux de défense de la plante (PAL, chitinases,  $\beta$ -1,3-glucanase), exploitation de l'existence de domaines protéiques communs aux différents gènes de résistance clonés à ce jour chez différentes espèces et pour différents pathogènes (stratégie analogues de gènes de résistance). Dans les 2 cas des produits d'amplification par PCR ont été obtenus et séquencés. La recherche de polymorphisme de séquence entre les parents de la carte est en cours.

Pour l'antracnose, une carte génétique est en cours de création en 2000; dans le cas de l'Aphanomyces, un QTL majeur expliquant 42% de la variation a été identifié sur une des populations de lignées recombinantes après la création d'une carte comportant 200 marqueurs AFLP.

#### • *Approche méthodologique de gestion des résistances quantitatives*

Dans la mesure où il n'existe, jusqu'à présent, aucune résistance totale aux parasites concernés, il apparaît nécessaire de mettre au point une stratégie de gestion des résistances partielles mises en évidence. Le degré d'avancement des travaux n'a pas permis jusqu'à présent de proposer de méthodologie complète de sélection assistée par marqueurs. Cependant, l'hypothèse de l'intérêt du cumul de gènes issus de sources de résistance de différentes origines est testée : deux croisements pyramidaux à 8 parents ont été mis en place (l'un pour le pois d'hiver, l'autre pour le pois de printemps), qui tendent à cumuler différentes origines de résistance partielle et à introduire la résistance dans du matériel agronomique. L'homogénéisation agronomique du matériel a été réalisée aux générations F2 et F3, et les tests de résistance F4 (2000 descendances) sont en cours. Du matériel végétal a été conservé à chaque génération de manière à être en mesure de valider l'utilisation des marqueurs par une démarche comparative sélection sur marqueurs / sélection sur tests de résistance / sélection conjointe.

#### ◆ **Commentaires et perspectives**

Le développement des approches de génomique fonctionnelle sera probablement un des axes majeurs des activités à l'avenir, lié à la disponibilité :

- ✓ de gènes de fonction connue chez le pois. La création de collections d'ESTs chez cette espèce est envisagée ;
- ✓ de gènes de fonction connue chez *Medicago truncatula* . Plusieurs collections d'ESTs ont été créées chez cette espèce, à partir de tissus infectés par des pathogènes ou de tissus intervenant dans des interactions symbiotiques (*Rhizobium* pour la symbiose fixatrice d'azote, *Glomus* pour la symbiose mycorhizienne). Cette effort déterminé de génomique chez *M. truncatula* pourra être valorisé chez le pois, avec des perspectives de génomique comparative et d'identification rapide chez le pois d'homologues de gènes intervenant dans des interactions plante / micro-organismes.

Par ailleurs, au plan de la recherche fondamentale, deux modèles génétiques de relations hôte / parasite en matière de résistances sont développés. Un modèle de résistance à un parasite des organes aériens (*Mycosphaerella*) et un modèles de résistance à un parasite tellurique (*Aphanomyces*). En particulier, lorsque nous développerons le volet de recherche en génomique fonctionnelle et celui relatif aux gènes candidats et aux séquences fonctionnelles pour la résistance, il sera particulièrement intéressant de comparer les mécanismes aériens aux telluriques dans lesquels les interactions avec la microflore tellurique interviendront vraisemblablement en tant que composante de la résistance. Le fait que le pois vit en symbiose avec une bactérie fixatrice de l'azote (*Rhizobium*) devra également être pris en considération dans l'évaluation des mécanismes de résistance, et en particulier au niveau de mécanismes communs (ou voisins) de reconnaissance plante / bactérie symbiotique et plante / organisme pathogène.

Enfin, il existe tout particulièrement chez les légumineuses une grande diversité de molécules, souvent de nature polyphénolique, protéique ou peptidique, exprimées dans les divers organes de la plante qui contribuent largement à la résistance de ces plantes aux différents pathogènes. L'identification de ces molécules est incomplète et leur mécanisme d'interactions avec les bioagresseurs souvent mal connu. La connaissance de ces interactions tant au plan biologique que physicochimique doit contribuer aux progrès génétiques, en particulier en surexprimant ces molécules dans les tissus cibles pour les bioagresseurs ; elle peut aussi favoriser la compréhension des processus d'adaptation des bioagresseurs. Cette démarche déjà engagée dans le cas du pois (INRA Nantes / INSA Lyon) pourrait être confortée en s'appuyant sur les travaux de génomique chez *Medicago truncatula*.

## ÉPIDEMIOLOGIE ET NUISIBILITE DES BIOAGRESSEURS

### ◆ Enjeux

*En intégrant les composantes "développement épidémique de la maladie ou modélisation démographique des populations de ravageurs" et "croissance et développement du couvert malade", cet axe de recherche vise à fournir des éléments permettant une estimation objective de l'impact des bioagresseurs et une pratique raisonnée de la protection des plantes (Tivoli, 1994; Ney et al., 1998).*

*Les recherches visent à modéliser la dynamique spatio-temporelle du développement des épidémies et des populations de ravageurs, et leurs effets sur l'élaboration du rendement.*

Une protection des cultures assurant, à la fois, des objectifs de production et la préservation de l'environnement nécessite une bonne compréhension du fonctionnement des systèmes parasitaires au sein de l'agro-écosystème. Le recours à la modélisation doit permettre de définir la dynamique de développement des risques parasitaires dans le temps et dans l'espace, en fonction de paramètres biotiques et abiotiques. Une telle formalisation des connaissances doit aussi conduire à l'identification des questions de recherche qui restent à résoudre pour une bonne compréhension du fonctionnement de ces pathosystèmes (enjeu cognitif), et de proposer des règles de décision pour les agriculteurs quant aux stades et méthodes d'intervention (enjeu économique).

Ce type d'étude est mené sur l'Anthracnose ainsi que sur les Sitones. Il est prévu à court terme de développer des études sur l'impact conjugué de deux ravageurs du pois le sitone et le puceron, en bénéficiant de l'expérience acquise il y a quelques années sur *A.pisum* (Badenhausser et al., 1991) et du travail en cours sur le sitone.

*En résumé, ces recherches s'organisent donc autour des objectifs scientifiques et socio-économiques suivants :*

1. Acquérir des éléments analytiques explicatifs du développement épidémique des maladies et des populations de ravageurs, et du fonctionnement des plantes sous contrainte biotique ;

2. Elaborer un modèle analytique du développement des épidémies, ainsi qu'un modèle de fonctionnement des couverts végétaux malades ;

3. Intégrer ces modèles en un modèle synthétique de fonctionnement du pathosystème (intégrant le développement de l'épidémie ou de l'épizootie, le fonctionnement de la culture sous contrainte biotique et le cycle du pathogène ou du ravageur) ;

4. Obtenir des éléments d'aide à la décision, pour une mise en œuvre d'itinéraires techniques diminuant le risque parasitaire et pour l'utilisation raisonnée des traitements phytosanitaires.

### ◆ Résultats acquis par la recherche

Cette thématique concerne d'une part, un ravageur (le sitone, *Sitona lineatus*) et d'autre part, un champignon aérien (*M. pinodes*) du pois protéagineux. Dans chacun des cas, les équipes se sont attachées à modéliser les phases du développement épidémique de chacun des bioagresseurs.

- *Elaboration de modèles de base*

Dans le premier cas, une approche agronomique préalable, conduite sur le puceron du Pois, a posé le problème des coïncidences entre stade phénologique du Pois et la dynamique des populations.

La modélisation des développements larvaire et embryonnaire des sitones en fonction de la température a été réalisée, et les différentes équations nécessitent des ajustements mineurs (Lerin *et al.*, 1997). En ce qui concerne la ponte, diverses tentatives de modélisation ont été menées, mais aucune ne donne pour l'instant complète satisfaction pour une approche prédictive, d'autant que la ponte d'un jour dépend de celle des jours précédents. L'impact des sitones sur le fonctionnement de la plante est étudié au niveau des relations entre le développement larvaire et la destruction des nodosités en tenant compte des effectifs des larves de sitones et de la structure des âges larvaires (Cantot, 1989; Williams *et al.*, 1995). Le stade phénologique de la plante au moment de l'infestation apparaît comme un facteur important de la nuisibilité du sitone du pois. Les attaques précoces (stade 2 feuilles) et massives entraînent une destruction rapide des nodosités et la teneur en azote de la plante au stade gousses plates, est diminuée. Les infestations tardives (stade 8 feuilles) n'ont pas cet effet.

Dans le cas de l'Anthracnose, les études en épidémiologie ont permis de développer dans un premier temps, des modèles descriptifs établissant les relations entre le pathogène (infection, développement de la maladie, apparition des fructifications) et les variables climatiques étudiées (températures, eau liquide et humidité relative saturante). Ces études sont menées dans le cadre de collaborations avec L. Huber (Bioclimatologie, Grignon) et J.S. Pierre pour la modélisation (ENSA Rennes). La température optimale pour le développement du cycle de la maladie est de 20°C. A cette température, les pycniospores germent en 2 heures, les appressoria se forment en 6 heures et les tubes germinatifs pénètrent au travers de la cuticule en 8 heures. Les symptômes de maladie apparaissent un jour après l'inoculation et les premières pycnides se forment après 3 jours. Des équations polynomiales sont établies pour prédire les stades d'infection, d'incubation, de latence et de développement de la maladie en fonction de la température et de la durée d'humidité.

#### • *Intégration des modèles*

Dans le cas de l'anthracnose, ces sous-modèles ont ensuite été agrégés dans un modèle analytique décrivant de façon quantitative et dynamique le développement de l'épidémie. Parallèlement, les études concernant la nuisibilité de la maladie et menées à l'échelle de l'organe, de la plante entière et de la plante en situation de peuplement (collaboration B. Ney et M.H. Jeuffroy, Agronomie de Grignon), permettent de préciser l'influence de facteurs aussi essentiels que la période d'attaque, le site de l'attaque sur la plante, et l'intensité de l'attaque, sur l'élaboration du rendement. L'activité photosynthétique de l'hôte est modifiée par la maladie et devient nulle quand seulement 30 à 40 % de la surface foliaire est nécrosée. Au champ, il est montré que les épidémies affectent la croissance des plantes, principalement par réduction de l'efficacité d'utilisation des radiations. Un modèle de fonctionnement du couvert affecté par la maladie a été élaboré. Il intègre la diminution du taux de photosynthèse dans les feuilles, le gradient vertical de l'intensité de la maladie et les différences d'activité photosynthétique dans les différentes strates du couvert.

#### ◆ *Recherches en cours*

Cette thématique est dans l'ensemble, assez peu développée en Europe. Il faut cependant citer l'équipe des pathologistes d'Espagne (Jimenez-Diaz, Cordoba) qui développe la même thématique sur l'anthracnose du pois chiche. Inversement, cette démarche intégrative est commune aux grands modèles mondiaux (Mildiou/Pomme de terre, Cercosporiose/Arachide, maladies foliaires/Blé, ...); elle a de fervents adeptes en Amérique du Nord et en Australie (Boote *et al.*, 1983).

### ◆ **Commentaires et perspectives**

Cette démarche intégrant développement épidémique et fonctionnement des couverts végétaux, est tout à fait originale en France. Elle s'inscrit dans le cadre de la réduction des intrants, et intéresse les structures professionnelles (UNIP, ITCF) dans la mesure où elle contribuera au développement de mesures intégrées de protection. Cette thématique repose à l'INRA sur une démarche pluridisciplinaire (avec les écophysiologistes, les bioclimatologistes, les modélisateurs et les généticiens de l'INRA) qui s'avère très efficace puisqu'elle a permis, dans le cas de l'Anthracnose, quatre co-encadrements de thèses en 8 ans et des publications communes. Nous nous dirigeons vers des études de faisabilité de transfert (outils de diagnostic cultural et/ou de prévision des risques), en incrémentant le modèle avec des aspects liés à l'architecture du couvert (aspect variétal) et en étendant l'étude à *Aphanomyces*. Il est bien évident que pour ce type de recherche, le lien avec le Département EA est essentiel. La modélisation du fonctionnement des pathosystèmes permettra à terme, d'utiliser ces données dans la prévision des risques. Dans ce domaine, des projets de recherche se fondant sur une démarche commune entre Lusignan et Rennes sont en cours d'harmonisation.

Les équipes INRA sont reconnues à l'extérieur, notamment par le fait qu'elles ne visent pas seulement à étudier les conséquences des attaques de bioagresseurs sur les peuplements végétaux, mais qu'elles étudient les phénomènes de base (épidémiologie, modèle analytique, perturbations physiologiques, élaboration du rendement) responsables des faits observés.

## **Conclusion**

La principale spécificité des recherches effectuées en France sur les contraintes biotiques est leur caractère intégratif qu'il convient de renforcer pour optimiser encore l'efficacité de nos recherches. Cela nécessite de :

- ✓ conforter notre démarche "filiale", qui favorise les approches pluridisciplinaires indispensables pour optimiser l'étude des pathosystèmes ;
- ✓ développer de nouveaux réseaux, au plan national et européen, pour intégrer les progrès de la génomique, favoriser l'utilisation des plantes modèles (*Arabidopsis thaliana* et *M. truncatula*). Le développement de la génomique structurale et fonctionnelle, les approches transcriptome et le clonage positionnel au sein du DGAP doivent permettre le développement de nouvelles stratégies de gestion des résistances.

Le caractère intégratif original de nos recherches justifierait qu'elles soient mieux valorisées dans les autres régions du globe productrices de légumineuses à grosses graines, et en particulier dans les pays du bassin méditerranéen.

### ◆ **Références bibliographiques**

- ✓ Badenhausser I, Bournoville R., Cantot P., Rivault E., Giraud E., 1991. Action du puceron *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Hom. Aphididae) sur les facteurs de production du pois protéagineux de printemps en phase de floraison. *J.appl. Entomol.*, 111 : 1-19.
- ✓ Hebblethwaite P.D., 1983. *The faba bean. A basis for improvement.* Edited by Hebblethwaite, University Press, Cambridge, 573pp.

- ✓ Hebblethwaite P.D., M.C. Heath, T.C.K. Dawkins, 1985. The pea crop. A basis for improvement. Edited by Hebblethwaite, Mid-County Press, London, 486pp.
- ✓ Ney B., Tivoli B., Bancal M.O., 1998 – Effets des agents pathogènes sur le fonctionnement de la plante et des populations cultivées. Modélisation de leur nuisibilité. In Fonctionnement des peuplements végétaux sous contraintes environnementales. Paris, 20-22 janvier 1998. Ed. INRA, Paris, 2000, Les colloques, 93 : 481-496.
- ✓ Tivoli B., 1994 – Conséquences des attaques parasitaires foliaires sur l'élaboration du rendement des plantes à croissance indéterminée. In Agrophysiologie du pois protéagineux, Ed. INRA, ITCF, UNIP, p 199-219.
- ✓ Williams L. III, Schotzko D.J., O'Keeffe E.O., 1995. Pea leaf weevil herbivory on pea seedlings : effects on growth response and yield. Entomologia experimentalis et applicata, 76 : 255-269.

#### ◆ **Adresses des laboratoires connus**

##### • *France*

- ✓ Eliane DUMAS-GAUDOT – UMR INRA-Université de Bourgogne Biochimie, Biologie Cellulaire et Ecologie des Interactions Plante-Microorganismes - INRA-CMSE - BV 1540 - 21034 DIJON Cedex

##### • *Etranger*

- ✓ John M. KRAFT et Georges VANDEMARK  
USDA-ARS - 24106, N. Bunn Road - Prosser, WA 99530-9687 - USA
- ✓ Clarice COYNE - USDA-ARS  
Washington State University - Pullman, WA 99163 - USA
- ✓ Vincent A. FRITZ - University of Minnesota  
Department of Horticulture, Southern Experiment Station - Waseca, MN 56093 - USA
- ✓ Mark SWEETINGHAM et Tanver KHAN - Département d'Agriculture de l'Etat de Western Australia – Perth – Australie
- ✓ Mark RAMSEY et Musharaf ALI - "South Australian for Research and Development Institute" (SARDI) – Adélaïde – Australie
- ✓ Trevor BRETAG et, Janbert BROUWER - "Victorian Institute for Dry Areas" (VIDA) – Orsham - Australie
- ✓ Rafael JIMENEZ-DIAZ – Instituto de Agricultura Sostenible, Apdo. 4084, 14080 Cordoba, Espagne.
- ✓ Angelo PORTA-PUGLIA – Istituto Sperimentale per la Patologia vegetale, via C.G. Bertero, 22, 00156 Roma, Italie.
- ✓ Mohamed KHARRAT – INRAT, Laboratoire des Légumineuses Alimentaires, rue Hedi Karray, 2049 Ariana, Tunisie.
- ✓ Mohamed SADIKI – Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Département d'Agronomie et d'Amélioration des Plantes, BP 6202, Rabat-Instituts, Rabat, Maroc
- ✓ Mauro DI VITO – Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Nematologia Agraria Applicata ai Vegetali, Via Amendola 165/A, 70126 Bari, Italie

### 3.4. Les apports de la génomique

#### ♦ Enjeux

La montée en puissance des approches globales de type génomique, qui concernent l'organisation des génomes (structure des génomes), l'expression des génomes (génomique fonctionnelle) et la comparaison des génomes (génomique comparative) constitue une révolution dans l'étude du fonctionnement des végétaux. La découverte de l'existence d'une forte similitude dans l'organisation des génomes (synténie) chez des plantes appartenant à une même famille botanique suggère que les progrès réalisés dans l'étude du génome d'une espèce seront utiles pour d'autres espèces proches. Pour les légumineuses, *Medicago truncatula* (Mtr) en raison de la faible taille de son génome (450 Mb), de sa diploïdie, de sa reproduction sexuée et de son cycle biologique court a été choisie comme espèce modèle en Europe et aux Etats-Unis. Par rapport à *Lotus japonicus*, l'autre légumineuse-modèle choisie par la communauté internationale, Mtr est plus proche d'un point de vue phylogénétique de la plupart des légumineuses cultivées en Europe : elle fait partie du groupe des Galégoïdes qui contient les tribus des Trifoliées (luzernes, trèfles), des Viciées (pois, féveroles, lentilles, vesces) et Cicerées (pois chiche).

Les enjeux pour la recherche sont donc de préparer le transfert rapide des connaissances acquises sur Mtr vers les légumineuses d'intérêt agronomique à plus gros génome. A l'INRA, la mise en place d'une *Action Transversale Structurante « Génétique et Génomique de la légumineuse-modèle Medicago truncatula »* (coordinateur Jean Dénarié) va favoriser ce transfert. Ce projet associe des chercheurs travaillant sur l'espèce modèle et sur les légumineuses importantes d'un point de vue agronomique (pois, luzerne), des chercheurs réalisant des approches de génétique moléculaire et de génomique et de la génétique et de l'amélioration « classiques ».

- *Confirmation de la synténie entre les génomes de Mtr et des principales légumineuses cultivées en Europe (pois, luzerne)*

La construction d'une *banque BAC de pois*, dont l'accès sera libre est actuellement réalisée par Khalid Meksem (Southern Illinois University, Carbondale) en collaboration avec Clarice Coyne (USDA-WSU, Pullman); 53 000 clones sont prévus pour la fin 2000 (avec un objectif de 200 000 clones couvrant 5 équivalents génome). Si une telle banque permet d'envisager de cloner des gènes chez le pois, l'utilisation de Mtr et des moyens importants en génomique mis en place autour de cette espèce modèle devrait faciliter considérablement l'aboutissement de tels projets.

La taille du génome du pois estimée à 4500 Mb aurait essentiellement pour origine l'accumulation de familles de séquences répétées de type (rétro)transposon (90 % du génome) ce qui laisse penser que la synténie est bien conservée entre les génomes de ces 2 espèces appartenant à des genres relativement proches au sein de la sous-famille des Papilionoideae. Des études préliminaires (N. Ellis en collaboration avec G. Kiss) semblent montrer que la *colinéarité des génomes* pois et luzerne diploïde est bonne.

Si la colinéarité entre génomes d'espèces proches a été établie dans plusieurs familles par alignement de cartes génétiques, les études de "*microcolinéarité*" sont encore peu nombreuses et notamment, peu de données existent sur la distribution des gènes par rapport aux séquences non-codantes chez des espèces à gros génome. Une étude de microsyténie entre le maïs (dont le génome de 2500 Mb se caractérise comme celui du pois par un fort pourcentage de séquences répétées type rétrotransposons) et le sorgho (750 Mb) (Tikhonov *et al.* 1999, PNAS 96:7409-7414) montre que la colinéarité est globalement bien maintenue à l'échelle du gène. On peut s'attendre au même cas de figure pour le pois et Mtr : une densité

des gènes chez Mtr comparable à celle observée chez *Arabidopsis* ou le sorgho et une densité beaucoup plus faible et très irrégulière chez le pois avec certains gènes pouvant être "noyés" dans de grands blocs de séquences répétées. Par conséquent, dans le meilleur des cas, le modèle Mtr serait une image simplifiée du génome du pois dont on aurait éliminé les 90 % de séquences répétées.

- *Exploiter les nouveaux outils de la génomique*

Le développement de la génomique, et notamment de la génomique fonctionnelle, va profondément modifier la biologie végétale dans les années à venir. Jusqu'à maintenant la recherche agronomique a, dans le secteur végétal, été cloisonnée entre approches génétiques (qui considèrent la plante comme une boîte noire), approches physiologiques (concentrées sur un petit nombre d'enzymes supposées jouer un rôle clé) et approches agronomiques (étudiant le fonctionnement des peuplement végétaux sous l'effet des facteurs du milieu sur des peuplements végétaux tout en ne considérant que peu ou pas le génome de ces peuplements et ses interactions avec le milieu). La génomique fonctionnelle devrait permettre le développement d'approches intégrées tenant compte du fonctionnement de centaines de gènes dans des conditions de cultures en peuplement et d'aborder des processus très complexes telle que la qualité des produits.

Dans un premier temps, ce sont des plantes modèles qui feront l'objet des recherches visant à mettre au point l'utilisation de méthodes génomiques pour étudier l'expression de centaines ou milliers de gènes dans des plantes cultivées individuellement dans des conditions environnementales bien définies et les changements induits dans l'expression de ces gènes lors de cultures en peuplements. En parallèle, ces approches de *génomique fonctionnelle* où la taille et la structure du génome ne constituent plus un obstacle, devront être appliquées chez les espèces agronomiques sur des processus bien définis.

Très récemment des efforts considérables ont été réalisés chez Mtr pour la construction de banques EST. On peut imaginer qu'à la fin 2000, il y aura plus de 100 000 EST séquencés chez cette espèce. Par conséquent, s'il n'existe pas à l'heure actuelle de projet en place pour le séquençage systématique du génome de Mtr tels que les projets *Arabidopsis* et riz, la disponibilité de ces données de séquence est déjà un atout essentiel pour les espèces proches (recherche de gènes homologues). De plus, si ces banques concernent essentiellement les gènes exprimés dans les tissus racinaires et intervenant dans les interactions plante/micro-organismes, de nombreux projets sont en cours pour intégrer d'autres processus d'intérêt agronomique tels que le développement et le remplissage des graines ou les interactions plante/pathogène des parties aériennes.

- ◆ *Résultats acquis par la recherche*

- *Une carte génétique consensus chez *Pisum sativum**

Depuis Mendel, le pois a toujours été un modèle en génétique du fait de l'abondance des mutations morphologiques et biochimiques répertoriées. Dès 1972, Blixt établit les premières cartes génétiques entre tous ces marqueurs. Avec l'apparition des marqueurs enzymatiques et moléculaires (RFLP) des incohérences dans l'établissement de groupes de liaisons sont mises en évidence par rapport aux premières cartes issues de l'analyse d'un grand nombre de croisements. Des études cytogénétiques et la construction en 1992 des premières cartes RFLP par N. Ellis (John Innes Centre, Norwich) à partir de 3 populations de lignées recombinantes permettent d'étudier les phénomènes de translocations réciproques qui perturbent l'établissement de groupes de liaisons lorsqu'un grand nombre de croisements interviennent. Ces phénomènes ne semblent cependant pas trop fréquents et en 1998 une carte génétique consensus de pois comportant 7 groupes de liaison ( $2n = 14$ ) a pu être établie et validée par les résultats obtenus dans 3 laboratoires différents à partir de 3 populations de lignées

recombinantes (Weeden *et al.* (1998) *Pisum Genetics* 30:1-4 ; Laucou *et al.* (1998) *Theor Appl Genet* 97:905-915). Ces cartes intègrent à la fois des marqueurs moléculaires (RFLP, RAPD, AFLP...) et des marqueurs classiques (mutations).

- *Etudes de synténie chez les légumineuses à graines*

Dans la sous-famille des Papilionoideae, les légumineuses cultivées se classent en 2 sous-groupes taxonomiques distincts : les luzernes, le pois, la lentille et le pois chiche d'un côté et de l'autre le soja, le haricot et le niébbé. Des études de synténie entre les génomes de ces espèces ont été réalisées à l'intérieur de chaque sous-groupe taxonomique essentiellement à partir de marqueurs RFLP (Simon CJ, Muehlbauer FJ (1997) *J. Hered.* 88:115-119 ; Boutin SR *et al.* (1995) *Genome* 38:928-937). Ces études mettent en évidence de gros blocs de synténie. Par contre, aucune étude n'a encore été réalisée entre les 2 sous-groupes. L'essor actuel de données de séquences permettant le développement de marqueurs consensus correspondant à des gènes va favoriser les études de synténie entre des espèces taxonomiquement éloignées.

- ◆ *Recherches en cours*

- *Contexte international et national de la génomique de *Medicago truncatula**

Le choix d'une légumineuse-modèle a permis le développement de programmes ambitieux de génomique des deux côtés de l'Atlantique.

- ✓ Un programme de génomique fonctionnelle et comparative sur Mtr a reçu de la NSF un financement de 3,8 millions US\$ pour la période 1999-2002 (coordinateur D. Cook ; <http://chrysie.tamu.edu/medicago>). Trois laboratoires européens (dont le LBM RPM INRA/CNRS de Toulouse), qui collaborent avec plusieurs des équipes américaines concernées, sont associés à ce programme, mais sans financement.
- ✓ La Noble Foundation (Ardmore, USA) développe également un programme important de génomique avec séquençage d'ESTs, mutagenèse insertionnelle, avec un intérêt particulier pour la symbiose endomycorhizienne et la synthèse de métabolites secondaires comme les isoflavonoïdes, qui sont des composés de grand intérêt médical.
- ✓ En France, un programme de génomique portant sur Mtr, réunissant 8 laboratoires, a été soutenu conjointement par le CNRS (programme "Génome") et l'INRA (programme "Génomes et Fonctions") pour une durée de 2 ans (1998-99). Ce projet comportait différents volets : cartographie génétique et physique, construction d'une banque de mutants d'insertion par transposon, analyse du protéome symbiotique, criblage de mutants symbiotiques, et séquençage de cDNAs symbiotiques.
- ✓ Le Génoscope (Evry) a réalisé le séquençage de 25.000 ESTs issus de 3 banques ADNc correspondant à trois situations physiologiques différentes (symbiose avec *Rhizobium*, symbiose mycorhizienne et racines témoins) et fournies par deux des laboratoires participant au programme INRA/CNRS. Les séquences d'ESTs ainsi produites sont traitées au LBM RPM CNRS-INRA de Toulouse, qui dispose déjà de solides compétences et infrastructures en bio-informatique (pôle Génome & Informatique de l'INRA-Toulouse).
- ✓ 75.000 ESTs de Mtr ont déjà été déposées dans les bases de données publiques, quantités du même ordre de grandeur que pour le riz ou *A. thaliana*.
- ✓ Un projet européen « Integrated structural, functional and comparative genomics of the model legume *Medicago truncatula* » est financé dans le cadre du 5<sup>e</sup> PCRD et associe onze participants.
- ✓ Des chercheurs de 16 pays différents travaillent déjà sur Mtr et des réunions internationales consacrées à Mtr ont déjà été organisées à Knoxville, USA (1996), Paris (1997), Amsterdam (1999).

- ✓ Une Action Transversale Structurante « Génétique et Génomique de la Légumineuse-modèle *Medicago truncatula* » a été mise en place à l'INRA en 2000 (coordinateur Jean Dénarié).
  - *Identification de QTL expliquant la variation de caractères d'intérêt agronomique chez le pois*

Actuellement, de nombreux programmes de cartographie sur des populations de lignées recombinantes se développent chez le pois dans l'objectif d'identifier des QTL ou des gènes expliquant la variation de caractères d'intérêt agronomique. On peut citer les groupes suivants :

- Claris Coyne (USDA-WSU, Pullman, USA) : résistance à *Aphanomyces*
- Rebecca Ford (University of Melbourne, Victoria, Australie) : résistance à *Mycosphaerella pinodes*
- INRA : résistance à *Mycosphaerella pinodes* et à *Aphanomyces*, composition protéique de la graine, résistance au gel, architecture et phénologie de la plante. A l'INRA, une grande partie de ces projets est réalisée dans le cadre de Génoplante.

Les marqueurs les plus utilisés dans ces différents programmes sont de type PCR spécifiques c'est-à-dire facilement transférables d'un laboratoire à l'autre :

- Microsatellites : le lancement fin 99 d'un "consortium microsatellites de pois" international par la société Agrogène devrait favoriser l'échange de ces marqueurs entre les laboratoires (dont l'INRA) et l'intégration des cartes issues de ces différents programmes.
- Marqueurs correspondant à des gènes de fonction connue et construits à partir des séquences disponibles dans les bases de données : un article a été publié sur cette approche en 1997 (Gilpin *et al.* (1997) *Theor Appl Genet* 95:1289-1299). A l'INRA, cette approche est menée dans un projet Génoplante et concerne les gènes susceptibles d'intervenir dans les thématiques traitées à l'INRA et citées ci-dessus. Ces marqueurs sont utilisés d'autre part pour confirmer et préciser la colinéarité des génomes pois et luzerne avec le génome de Mtr.

#### ◆ **Commentaires et perspectives**

##### • *Chez Mtr*

A moyen terme, l'avancée des connaissances sur Mtr devrait permettre d'accélérer les études qui concernent notamment les processus de reconnaissance (*symbiose* avec des bactéries ou des champignons endomycorhiziens, réaction de *résistance* à des parasites telluriques) et les mécanismes impliqués dans la qualité (*protéines de graine, parois cellulaires,...*).

##### Etude des relations hôte/ pathogène chez Mtr

Etudier et exploiter la biodiversité génétique de Mtr

L'équipe de J.M. Prospéri à Montpellier a constitué une importante collection de populations naturelles de Mtr. Cette collection, qui est en train de devenir une ressource importante au niveau international, doit être exploitée en France pour permettre l'étude et l'exploitation de caractères difficiles à étudier chez *Arabidopsis thaliana*.

Des études récentes ont montré que les gènes de résistance (gènes R) aux pathogènes et aux parasites ne conservent leur efficacité que lorsqu'ils sont transférés au sein d'une famille botanique : par exemple des gènes R isolés de tomate (Solanées) sont efficaces chez la pomme de terre (Solanées) mais pas chez *Arabidopsis thaliana* (une Crucifère), tandis que des gènes R isolés d'*A. thaliana* sont efficaces chez le colza mais pas chez les Solanées.

Il est donc important de constituer des collections de gènes R pour chaque famille botanique importante d'un point de vue agronomique. Les populations de Mtr serviront comme ressources génétiques pour l'identification de nouvelles sources de résistance mono- ou oligogéniques chez les légumineuses.

De tels projets qui utilisent la collection de Montpellier ont commencé dans plusieurs laboratoires américains (D. Cook, Davis University ; N. Young, Minnesota University ; David Mc Bird, North Carolina State University) et dans le cadre de l'ATS INRA.

#### Etude du remplissage des graines chez Mtr

L'étude du remplissage des graines chez *A. thaliana* va certainement fournir des données importantes sur les mécanismes généraux intervenant dans ce processus. Mais les graines de légumineuses peuvent avoir une composition bien différente tant dans les proportions de constituants de base (lipides, protéines, hydrates de carbone) que dans la structure de ces constituants (protéines particulières). Il est donc important de faire une étude de génomique et de protéomique sur la qualité et le remplissage des graines chez une légumineuse comme Mtr qui est proche, phylogénétiquement, du pois et de la féverole et d'utiliser ces approches pour explorer la diversité existant chez divers génotypes.

#### • *Chez les légumineuses cultivées*

La nécessité de concentrer les efforts de la communauté scientifique internationale sur un nombre restreint d'espèces empêche d'envisager des projets génomiques à grande échelle sur les légumineuses cultivées. Cependant si la taille du génome de ces espèces et l'importance des séquences répétées dans ces génomes rendent difficile le clonage de gènes, il n'y a pas de limites techniques à envisager des projets portant sur les gènes exprimés tels que la construction de banques EST : les nouvelles techniques d'hybridation soustractives (SSH) permettent d'accéder à des gènes exprimés spécifiquement dans des conditions données et, de plus, faiblement exprimés. Ce type d'approche paraît tout à fait complémentaire des projets menés sur l'espèce modèle en étudiant des aspects très spécifiques de l'espèce cultivée. D'autre part, il semble que de plus en plus des données de séquençage sur les espèces cultivées permettraient d'accélérer le transfert des connaissances acquises sur Mtr : développement rapide de marqueurs consensus, application des technologies de microarrays et d'analyse de données ; en effet, il ne semble pas possible d'utiliser les microarrays développés sur Mtr avec des sondes pois (importance des bruits de fond).

#### ♦ **Références bibliographiques**

- ✓ Cook DR (1999) *Medicago truncatula* : a model in the making ! *Curr. Opin. Plant Biol.* 2:301-304.
- ✓ Ellis et al. (1992) Linkage maps in pea. *Genetics* 130:649-663.
- ✓ Ellis THN (1993) The nuclear genome. In : Casey R, Davies DR (eds). *Peas : genetics, molecular biology and biotechnology*. CAB Int, Wallingford, UK, pp 13-47.

#### ♦ **Adresses des laboratoires connus**

##### • *Pois*

- ✓ Noel Ellis, Department of Applied Genetics, John Innes Centre, Colney Lane, Norwich NR4 7UH, UK
- ✓ N. Weeden, College of Agriculture, Montana State University, Bozeman, Montana, USA
- ✓ Clarice J. Coyne, USDA-ARS Western Regional Plant Introduction, Washington State University, Pullman, WA, USA 99164-6402

- *Medicago truncatula*

- ✓ Jean Dénarié, David Barker, Pascal Gamas et Thierry Huguet, Laboratoire de Biologie Moléculaire des Relations Plantes-Microorganismes, CNRS-INRA, BP27, 31326 Castanet-Tolosan cedex France
- ✓ Douglas R. Cook, Department of Plant Pathology, University of California, One Shields Avenue, Davis, CA 95616-8680 (drcook@ucdavis.edu)

## **4. QUALITE ET UTILISATION**

## Introduction

L'alimentation animale constitue la première utilisation des protéagineux en Europe (86,7 % des graines de pois en 1999). La volonté des pouvoirs publics de pallier la forte dépendance de l'Europe vis-à-vis des importations de matières riches en protéines, notamment de soja américain, et la création en Europe, et tout particulièrement en France, de variétés à graines sans tannins et à faible teneur en facteurs antinutritionnels, ont permis un réel essor de cette production pour l'alimentation des porcs et des volailles. En se fondant sur les taux moyens d'incorporation pratiqués par l'industrie, le potentiel européen s'élèverait à 12 MT, soit le double de la production actuelle, indépendamment des conséquences de l'épidémie ESB qui pourraient entraîner une augmentation de l'incorporation des protéines végétales. Les principaux freins à une utilisation plus importante du pois dans les formulations d'aliments sont l'instabilité de la teneur en protéines des lots achetés et, dans une moindre mesure, une digestibilité perfectible due à la structure et/ou la composition de l'amidon et des protéines de réserve. L'avenir de la culture des plantes protéagineuses en France et en Europe tient à la capacité dont nous allons faire preuve pour rendre rapidement cette culture compétitive en terme de rendement et de qualité.

Les protéagineux constituent aussi une source de protéines intéressantes pour l'alimentation humaine, soit sous forme de graines à l'exportation (Inde, Pakistan), soit sous forme de produits fractionnés enrichis en protéines (concentrats, isolats). Le potentiel de ces graines pour des valorisations nouvelles dans le domaine non-alimentaire (matériaux, adhésifs, colles..) ou comme « bioréacteur » pour la production, par manipulation génétique, de nouveaux produits tels que des produits pharmaceutiques, des anticorps, des enzymes industrielles, des produits chimiques, etc ..., mérite d'être considéré dans une perspective de diversification des utilisations, qui favoriserait la pérennité de cette production fragilisée par une mono-utilisation. Cette diversification est conditionnée par une maîtrise de la composition des graines.

### 4.1. Elaboration de la graine et composition

#### ◆ Enjeux

La phase d'élaboration de la graine est l'ultime étape qui conduit de la graine semée à la graine récoltée. Cette phase, au cours de laquelle des facteurs aussi bien génétiques qu'environnementaux, et leurs interactions, s'expriment, détermine en grande partie le rendement et la composition de la graine. Elle comprend l'ensemble des processus qui, partant d'un ovule, aboutissent à la graine sèche et recouvre les étapes de fécondation, nouaison, remplissage de la graine et dessiccation. Les phénomènes biologiques mis en jeu sont des phénomènes de développement (division cellulaire, organogenèse, ...) qui sont assez bien décrits mais dont on ignore tout ou presque du mécanisme et des contrôles. Les mécanismes de transport des assimilats et les voies de biosynthèse des réserves (amidon, lipides, protéines) sont par contre assez bien connus (enzymes, gènes) et il a été possible dans quelques cas d'obtenir assez simplement (mutagenèse, sélection), des modifications de composition des réserves amyliques ou lipidiques. On ignore, en revanche, tout des mécanismes de régulation (facteurs de transcription, promoteurs...) qui contrôlent la synthèse des grandes familles de protéines de réserve. De même, le processus d'édification du grain d'amidon, dont dépendent beaucoup de ses propriétés fonctionnelles, reste mal connu. *L'élaboration de la graine est extrêmement complexe, et l'approfondissement des connaissances sur les phénomènes biologiques impliqués est le préalable à leur manipulation par les techniques biotechnologiques pour la création de nouvelles variétés améliorées pour la qualité des graines (composition, propriétés fonctionnelles des réserves).*

## ◆ Résultats acquis par la recherche

### DEVELOPPEMENT DE LA GRAINE

#### • La mise en place des structures cellulaires

Dès la fécondation de l'ovule, le zygote diploïde entre dans une phase de morphogénèse, caractérisée par des divisions cellulaires actives sans accumulation de réserves, qui aboutit à la constitution de l'embryon, entité autonome capable d'assurer son propre développement à partir des assimilats fournis par la plante mère. Le potentiel de divisions cellulaires dépend du génotype et est très fortement relié à la taille de la graine, avec un contrôle maternel très fort sur la vitesse de division cellulaire.

Les conditions environnementales et la disponibilité en assimilats ont durant cette phase une influence prépondérante sur les facteurs du rendement via les avortements de graines et le nombre de cellules par graine. Les chaînes de transduction existant entre les stimuli environnementaux et leurs effets sur le développement de la graine sont très mal connues. Elles mettent en jeu des facteurs hormonaux et métaboliques dont les effets sur le programme de développement de l'embryon commencent à être analysés avec succès grâce aux études sur des espèces modèles par des approches de génétique et de physiologie moléculaires.

#### • L'accumulation des réserves et la dessiccation

La phase de maturation succède à la phase de division cellulaire. Lorsque le nombre de cellules d'une graine est fixé, la graine entre dans une phase de remplissage et devient alors un organe « puits » prioritaire, insensible aux avortements. Le nombre de ses cellules détermine la taille potentielle de la graine mature. Cette phase consiste principalement en la synthèse des réserves dans les cotylédons dans le cas des graines exalbuminées comme celles des protéagineux. L'essentiel de la biomasse de la graine est synthétisée durant cette phase. Bien qu'il n'y ait plus de divisions cellulaires, la duplication de l'ADN continue parallèlement à la synthèse des réserves et le contenu en ADN des noyaux peut atteindre des valeurs élevées (jusqu'à 128C chez le pois). Ce phénomène d'endoreduplication reste très mal connu et, en particulier, ses relations supposées avec la vitesse de synthèse des réserves et la composition de la graine. Durant cette phase de remplissage la taille maximale des cellules est fixée. Son déterminisme est complexe et fait intervenir des facteurs à la fois génétiques (endoreduplication ?) et environnementaux (température). Pendant la phase de remplissage la composition de la graine en amidon et protéines est déterminée.

Une phase de dessiccation termine l'élaboration de la graine. Bien qu'il n'y ait plus de synthèse de réserves, la graine est encore le siège d'une activité biologique essentielle pour sa conservation et son développement ultérieur (germination).

### DETERMINISME DE LA TENEUR EN PROTEINES DE LA GRAINE

La teneur en protéines des graines est fonction du ratio réserves amylacées/réserves protéiques. La vitesse d'accumulation de matière sèche d'une graine est déterminée par le nombre de ses cellules, elle n'est pas modifiée au cours du temps par les fluctuations de la disponibilité en photoassimilats, grâce à des remobilisations au sein des organes maternels. Cette vitesse peut néanmoins être limitée par le niveau d'activité de certaines enzymes impliquées dans les métabolismes de synthèse des réserves. En revanche, la vitesse d'accumulation d'azote dans les graines dépend de la quantité d'assimilats azotés disponibles dans la plante, soit sous forme d'azote remobilisable présent au début du remplissage des graines, soit sous forme d'azote minéral prélevé pendant le remplissage. La caractérisation de l'offre en azote a permis d'établir la relation entre la vitesse d'accumulation d'azote d'une graine et la disponibilité en azote dans la plante. La vitesse maximale d'accumulation d'azote d'une graine pourrait être variable entre génotypes.

La teneur en azote des graines dépend, à une constante près (dans la graine, la respiration modifie le rapport C/N), de la teneur moyenne en azote des assimilats fournis par la plante mère, c'est-à-dire des réserves qu'elle a constituées durant la phase végétative, de son aptitude à les remobiliser, et de son aptitude à absorber/fixer de l'azote tardivement. *Des variations de vitesses d'accumulation d'azote pourraient traduire une variabilité génétique des capacités de remobilisation, de fixation tardive, et de synthèse des réserves protéiques.*

L'importante variabilité génétique mise en évidence pour la teneur en protéines des graines en particulier grâce au programme européen ECLAIR PEA laisse présager que des progrès génétiques sont possibles pour ce caractère.

## DETERMINISME DE LA COMPOSITION DES RESERVES PROTEIQUES

Les protéines de la graine peuvent être distinguées en deux groupes : les protéines de réserve (PR) et les protéines ayant un rôle métabolique ou de défense (PMD).

Les protéines de réserves des protéagineux sont constituées de deux familles majeures : (i) des albumines, groupe hétérogène de protéines de type 2S dont 2 (PA1 et PA2) sont abondantes chez le pois et (ii) des globulines de type 7S (vicilines/convicilines) et de type 11S (légumine). Elles sont déposées dans des corpuscules protéiques, organites de stockage des cellules cotylédonaire. Les différentes sous-unités de légumine et de viciline peuvent varier en taille, point isoélectrique et degré de glycosylation. Un nombre important de polypeptides différents existent, de telle sorte qu'un nombre considérable de combinaisons est possible. Les différentes sous-unités de légumine et de viciline sont codées par des familles multigéniques dont le nombre de copies n'est pas clairement établi. Il existerait au moins 24 gènes de viciline/conviciline répartis sur 7 loci, et 10 gènes de légumine répartis sur 3 loci. Un certain nombre de séquences protéiques et nucléiques de vicilines et légumine sont disponibles pour plusieurs légumineuses. Elles ont montré que légumine et vicilines présentent des motifs conservés entre elles, et que les différents gènes de chaque famille multigénique se répartissent en groupe d'homologie plus ou moins grande. La fraction protéique de la graine de pois semble particulièrement complexe, en raison d'un polymorphisme important au sein de chaque famille. La synthèse des grandes familles de protéines de réserve est sous le contrôle de facteurs *cis* (motifs d'ADN de régions promotrices) dont les interactions avec des régulateurs *trans* (facteur de transcription par exemple)<sup>1</sup> vont assurer le contrôle spatial et temporel de l'expression des gènes qui les codent. L'identification de ces régulateurs et l'étude de leurs interactions ne font que commencer.

La classe des PMD pour lesquelles les données sont extrêmement parcellaires rassemble de nombreuses protéines de type albumine quantitativement mineures et possédant des activités biologiques diverses. On s'est surtout intéressé au plan international aux lectines et aux inhibiteurs de protéases pour leurs effets antinutritionnels. Or des études récentes sur les albumines de pois (PA1 et PA2) démontrent l'intérêt de ces protéines de faible poids moléculaires pour leurs propriétés technologiques ou biologiques.

Les caractéristiques nutritionnelles et technologiques des différentes familles de protéines de légumineuses dépendent de leurs propriétés : solubilité, richesse en acides aminés soufrés et tryptophane (acides aminés essentiels pour l'alimentation des monogastriques et humaine), digestibilité par les enzymes digestives, et propriétés gélifiantes et émulsifiantes variables. La composition des réserves protéiques est sous contrôle à la fois génétique – les génotypes de l'embryon et de la plante mère interviennent - et environnemental. Chez le pois, une carence en azote entraîne une diminution de la fraction légumine, alors que le mode de nutrition azotée - fixation *versus* assimilation - ne modifie pas la proportion des différentes familles. De plus, la température au cours du remplissage affecte l'accumulation des vicilines, légumine et albumine PA1, sans modification de la teneur en protéines. Enfin, les mutations provoquant un phénotype ridé (voir paragraphe suivant) produisent une modification pléiotropique de la composition protéique des graines dans 4 cas sur 5 du fait de l'altération de la synthèse des légumine et la promotion de la synthèse des albumines PA1 et PA2.

Pour la composition en acides aminés, le pois contient une teneur élevée en lysine, mais est déficient en méthionine, cystéine, et tryptophane. Cette composition apparaît peu variable dans l'échantillon analysé dans le programme ECLAIR. L'amélioration de ce caractère, essentiel pour l'usage des protéagineux comme aliment, est malheureusement difficile à incorporer dans un programme de génétique classique du fait du coût et de la difficulté de son évaluation<sup>2</sup>. Dans ce domaine une expérience pionnière (introduction par transgénèse du gène codant pour une albumine de tournesol riche en méthionine dans le lupin) a été réalisée en Australie; les graines transgéniques obtenues sont effectivement un peu plus riches en acides

<sup>1</sup> Exemple de régulateur *trans* : la protéine FUS3 qui, en se fixant sur un régulateur *cis* spécifique -le domaine RY (CATGCATG) de la « legumin box » par exemple- permet l'expression des gènes qui possèdent ce domaine dans leur promoteur *dans la graine, et dans elle seule* (Reidt et al., 2000).

<sup>2</sup> Par exemple la détermination de la composition complète en acides aminés d'une farine nécessite 3 hydrolyses acides (2 pendant 24h, 1 pendant 48h) dont une après oxydation performique (détermination des acides aminés soufrés) et 1 hydrolyse alcaline (détermination du Trp) et autant d'analyses !

aminés soufrés et ont une valeur biologique légèrement améliorée (Molvig *et al.*, 1997). De nombreuses approches analogues sont probablement en cours actuellement dans le monde mais la confidentialité est la règle dans ce domaine. L'Université de Purdue (USA) a engagé depuis environ 5 ans des programmes importants sur la transformation du soja et les processus de maturation des protéines de réserve (expression, modification post-traductionnelle, routage) de manière à maîtriser les étapes de la biosynthèse. Des recherches sont en cours sur l'étude des mécanismes d'élaboration de la structure tridimensionnelle de l'une des deux protéines majeures de la graine, la glycinine (11S). Le système biomimétique qui a été développé permet d'examiner les propriétés d'assemblage des différentes isoformes de la protéine et constitue un outil expérimental performant d'une part pour l'étude structurale des ces protéines et d'autre part pour engager des stratégies de mutagenèse dirigée (amélioration des propriétés nutritionnelles et fonctionnelles). De telles approches pourraient être mises en œuvre dans le cas du pois ou des plantes modèles.

D'une manière générale, la science des protéines des graines de légumineuses, comme celle des protéines de graines en général est en retard si l'on considère les avancées au sein du champ disciplinaire dans son ensemble. Cela est dû certes à un inventaire incomplet des propriétés et fonctions de ces protéines mais aussi à la difficulté d'appliquer les outils performants de la biochimie structurale à ces protéines à cause de leur important polymorphisme lié à l'existence de familles multigéniques.

### DETERMINISME DE LA COMPOSITION DES RESERVES AMYLACEES

L'amidon constitue la principale réserve des protéagineux européens (pois et féverole). Il est synthétisé dans les amyloplastes des cotylédons et se présente sous l'aspect de grains de forme et de composition spécifiques de l'espèce. Du point de vue chimique il s'agit d'un polycondensat d' $\alpha$ -D-glucose. L'amidon est généralement constitué d'un mélange de 2 macromolécules : i) l'amylose, formé de longues chaînes (plusieurs centaines d'unités glucose) peu ramifiées et ii) l'amylopectine, formé de courtes chaînes (une vingtaine d'unité glucose) très ramifiées et organisées en structure semi-cristalline. Les propriétés fonctionnelles de l'amidon dépendent beaucoup des proportions de ces deux composants. La voie de synthèse de l'amidon est bien connue grâce à l'étude de mutants ridés (voir ci-dessous). Cependant, à côté de ces critères biochimiques, la taille des grains d'amidon et leur structure sont des caractéristiques qualitatives importantes dont le déterminisme reste inconnu à ce jour.

Les variétés commerciales de pois protéagineux ont toutes des graines de type « grain rond lisse » et la composition de leur amidon est peu variable. Il existe néanmoins des génotypes à graines ridées, qui présentent des variations importantes de teneur et de composition de leur amidon. La plupart des variétés de pois potager utilisées en alimentation humaine font partie de cette catégorie, car les graines immatures des variétés ridées sont plus riches en saccharose et ont de ce fait un goût sucré recherché en alimentation humaine. Elles sont aussi potentiellement utilisables pour des applications non-alimentaires, car leur amidon peut présenter des propriétés fonctionnelles très modifiées. Cinq mutations conduisent au phénotype « graine ridée » ; elles ont toutes été caractérisées<sup>3</sup>. Ces mutants ont été initialement isolés et caractérisés au John Innes Centre (Norwich), une autre famille de ces mutants a été obtenue par l'INRA (GAP Dijon). Toutes ces mutations entraînent une diminution plus ou moins importante de la teneur en amidon dans la graine, ce qui provoque une augmentation concomitante de leur teneur en protéines et en lipides, et, pour certaines, une modification du rapport amylose/amylopectine.

Les amidons de légumineuses et de pois en particulier diffèrent des amidons de céréales i) par une teneur en amylose élevée favorable aux propriétés de fusion en extrusion pour la préparation de biomatériaux et ii) par une modification de la structure de l'amylopectine, en

<sup>3</sup> Elles affectent des gènes impliqués dans la synthèse de l'amidon. Les mutants *r* sont défectifs pour une enzyme branchante de l'amidon, *rb* pour une ADP-glucose pyrophosphorylase plastidiale, *rug3* pour la phosphoglucomutase plastidiale, *rug4* pour une saccharose synthase et *rug5* pour une amidon synthase.

particulier son taux de branchement. Un corollaire de ces variations moléculaires est la variation des structures cristallines. On connaît deux types de structure cristalline dans l'amidon, A et B, caractéristiques des céréales et des tubercules respectivement et facilement identifiable. *L'amidon de pois contient ces deux types de structures cristallines et leurs proportions sont sensibles aux conditions environnementales pendant la maturation.* La digestibilité de l'amidon natif essentielle en alimentation animale où les grains sont peu, voire pas du tout endommagés, est fortement corrélée à la teneur en cristaux de type B, sans que le lien causal n'ait été identifié.

Les propriétés de gélatinisation dépendent de la structure cristalline et de l'organisation sans que le rôle exact du type cristallin n'ait pu être cerné à ce jour. Par contre les propriétés de gélification sont fortement influencées par les teneurs en amylose et en lipides monoacylés des graines. *Le comportement épaississant et gélifiant supérieur à celui des amidons de céréales et une plus grande facilité d'obtention d'amidon résistant à l'hydrolyse enzymatique sont des caractéristiques de l'amidon de pois qui s'expliquent par leur teneur en amylose, cible à considérer en amélioration.*

Les propriétés particulières de l'amidon de pois restent encore mal exploitées, aussi bien sur le plan fonctionnel que nutritionnel, du fait de la faiblesse de la filière de transformation face aux grands groupes amidonniers qui ont fondé leur puissance sur le blé et le maïs. Une telle exploitation serait une source de diversification de la production de pois protéagineux.

#### POLYSACCHARIDES PARIETAUX ET $\alpha$ -GALACTOSIDES

Les glucides pariétaux des graines de légumineuses sont assez peu connus. Seuls quelques travaux ont été effectués sur les téguments, leur composition et leur utilisation nutritionnelle chez l'homme ou chez l'animal. Cette fraction assez riche en pectines, a un effet relativement limité sur la mobilité colique chez l'homme sain et a une valeur en énergie digestible assez faible chez le porc. L'action PEA-ECLAIR indiquait que les teneurs en parois pouvaient expliquer des variations de digestibilité de l'amidon chez les coquelets. Les résultats de l'AIP ALIMAN (1997-1998) suggèrent que l'organisation des parois cotylédonaire (tailles cellulaires) plus que la teneur totale en parois expliquerait des sensibilités différentes au broyage et la dégradabilité *in sacco*.

La teneur en parois tégumentaires est étroitement liée à la taille de la graine. Elle est probablement aussi déterminée par les mécanismes de construction des parois : construction du réseau cellulosique, dépôt d'hémicellulose, de pectines, puis de lignines. Il existe en effet des variations de teneur en parois cotylédonaire et de résistance des parois au broyage, indépendantes de la taille des cellules. La lacune de ces travaux est d'avoir négligé la taille et l'épaisseur des parois aux profits de méthodes biochimiques plus faciles à mettre en œuvre.

Les  $\alpha$ -galactosides sont des oligoholosides présents (5 % environ) dans les graines de légumineuses. Ils dérivent tous d'un triholoside, le raffinose, les plus abondants sont le stachyose et le verbascose. Dans la graine, ils sont synthétisés en fin de période de maturation et semblent impliqués dans la résistance à la dessiccation, la viabilité de la graine sur le long terme et la résistance au froid. Ils ne sont pas digestibles par les monogastriques. Ils sont accusés d'être responsables de la flatulence que provoque la consommation des graines de légumineuses et, en conséquence, de limiter le développement de leur consommation dans les pays du nord de l'Europe notamment. En ce qui concerne l'alimentation animale, ils contribuent à limiter la digestibilité des protéagineux, mais le contenu en  $\alpha$ -galactosides des variétés modernes est maintenu à un niveau assez bas par la sélection. Les études sur les  $\alpha$ -galactosides sont actuellement très nombreuses, spécialement sur les espèces modèles.

### ◆ **Recherches en cours**

Un grand nombre de recherches sur l'élaboration de la graine sont effectuées dans le monde. Les méthodes d'approche vont de la génomique et la génétique moléculaire à la physiologie plante entière :

- ✓ Les approches de génétique et de physiologie moléculaires aboutiront à une connaissance approfondie du fonctionnement du vivant. Ce genre d'approche va certainement permettre de progresser considérablement dans la compréhension de l'embryogenèse et du contrôle de la composition en protéines. Le développement de travaux sur des espèces modèles (*Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula*) est nécessaire. Ils doivent s'appuyer non seulement sur la génomique mais aussi sur le développement de la protéomique pour compléter l'inventaire des protéines exprimées dans ces graines à divers stades de développement et appréhender leur fonction. Ceci devrait aider à l'identification de nouvelles protéines importantes dans le développement de la graine, pour sa défense contre les agents pathogènes ou les prédateurs, et/ou intéressantes pour des valorisations nutritionnelles ou fonctionnelles.

***Le pois, une plante modèle nécessaire pour l'étude du métabolisme de l'amidon.*** Les 2 plantes modèles, *Arabidopsis thaliana* et *Medicago truncatula*, sont deux plantes que l'on peut considérer comme des oléo-protéagineux car leurs graines ne contiennent pas d'amidon. Les études approfondies sur l'amidon et particulièrement celles qui concernent les événements qui déterminent leurs propriétés fonctionnelles, sont plus aisément menées avec des espèces comme le pois, le maïs ou le riz pour lesquelles on possède un grand nombre de mutants affectés dans la synthèse de l'amidon. L'amidon de pois, du fait de l'absence de lipides complexables et de l'existence d'une structure granulaire, est un amidon banal bien adapté aux approches génériques. Un projet transversal sur la Biosynthèse de l'amidon a été déposé en 2000 et sera fondé sur le pois et le maïs.

- ✓ L'approche plante entière consiste en l'étude de l'influence des événements développementaux et environnementaux qui régulent les flux de carbone et d'azote entre la plante mère et la graine. Les résultats obtenus permettront de formuler des hypothèses de fonctionnement de la graine en développement qui pourront être éventuellement approfondies par une approche de génétique moléculaire mais surtout être appliquées directement à la production ou bien être utilisées pour la modéliser.

Les travaux en cours à l'INRA recouvrent ces deux types d'approches :

- ✓ Dans le domaine de la physiologie de la plante entière, les études menées en agronomie (INRA Dijon) portent sur i) le déterminisme du nombre de cellules cotylédonaire en relation avec les flux de carbone et d'azote dans les plantes et les conditions environnementales, ii) l'accumulation des réserves, iii) les mécanismes impliqués dans la remobilisation de l'azote et notamment leur contrôle et leur sensibilité aux conditions environnementales. En particulier, peu d'enzymes et de gènes impliqués dans ces processus ont été identifiés chez les légumineuses comme chez les autres espèces. Il en résulte un travail de modélisation du remplissage des graines et de leur qualité protéique utile pour déterminer les phases critiques ou limitantes de cette importante fonction ou mettre en évidence une variabilité exploitable en amélioration des plantes par une approche de type QTL.
- ✓ Parallèlement, les travaux en cours en Biologie Végétale (INRA-Versailles) visent à améliorer la compréhension du développement de la graine. Les approches sont basées sur l'étude d'enzymes (saccharose synthase) et d'évènements développementaux (division cellulaire) impliqués dans l'expression de la force puits des graines et la caractérisation biochimique et moléculaire de mutants de maturation (ridés notamment). En outre, des études sur des évènements environnementaux qui interviennent sur certaines propriétés fonctionnelles des réserves ont été menées en collaboration (AIP AGRAP). Enfin, la

préparation de promoteurs permettant le contrôle spatial et temporel de l'expression des gènes a été entreprise.

- ✓ En ce qui concerne la composition protéique des graines, les travaux en cours à l'INRA (GAP Dijon) ont pour objectif de localiser des QTL de caractères associés à la composition de la graine, pour disséquer le déterminisme complexe de la composition de la graine. Afin de développer une approche « gènes candidats », ce projet s'appuie sur la construction d'une carte de gènes connus chez le pois menée à l'INRA (GAP Versailles). Dans le cadre de ce projet, les gènes dont la fonction peut *a priori* jouer un rôle dans le remplissage de la graine seront cartographiés. Les homologues de gènes identifiés dans des espèces autres que le pois seront recherchés. Ces travaux correspondent à des programmes Génoplante.
- ✓ Les propriétés biologiques, nutritionnelles et technologiques de protéines de légumineuses sont évaluées à l'UBTP (INRA-Nantes). Les travaux ont permis de mettre en évidence (i) l'influence majeure de la conformation des protéines de réserve, oligomériques, sur leur propriétés fonctionnelles, (ii) que ces propriétés dépendaient de l'aptitude de ces protéines à se dissocier plus ou moins facilement en sous-unités en fonction des traitements technologiques (T°C, pH, sels). Ils ont démontré les propriétés tensioactives supérieures des vicilines par rapport aux légumineuses, et que d'une manière générale les protéines de pois possédaient de très bonnes propriétés interfaciales, comparables ou supérieures à celles de soja mais étaient pénalisées dans les utilisations alimentaires par leurs plus faibles propriétés gélifiantes. Des travaux récents ont montré l'intérêt de la fraction albumine pour ses propriétés techno-fonctionnelles et biologiques. La fonction de défense contre les charançons de l'albumine PA1b a été démontrée en collaboration avec le LBA - INSA (Lyon).
- ✓ En ce qui concerne la composition en amidon, les travaux en cours à l'URPOI (INRA-Nantes) intègrent systématiquement l'amidon de pois dans les études génériques (voir ci-dessus)

Quelle que soit l'espèce étudiée, toutes les recherches sur le développement de la graine et sur les mécanismes mis en jeu lors de l'élaboration des réserves peuvent produire des résultats intéressants pour les protéagineux. Il est impossible de citer tous les laboratoires qui sont ou seront dans un futur proche impliqués dans l'analyse de mutants d'insertion de T-DNA dans *Arabidopsis* (GAP-Versailles, G. Pelletier) et de *Medicago truncatula* (ISV-Gif/Yvette, P. Ratet) pour des aspects d'élaboration de la graine. Retenons par exemple, hors INRA, le laboratoire de l'ISV-Gif/Yvette (J. Giraudat) qui s'intéresse à la phase de dessiccation de la graine. Un Programme Structurant en génomique, sur *Medicago truncatula* (qui présente l'avantage d'être très proche, du point de vue phylogénétique, des genres *Pisum* et *Vicia*) vient d'être ouvert. Il implique pratiquement tous les laboratoires de l'INRA cité plus haut et l'aspect «élaboration des réserves» figurent dans ce programme. Citons enfin une étude fondamentale sur les mécanismes mis en jeu lors de la remobilisation de l'azote au cours de la synthèse des réserves qui est en cours de développement à l'UNAP (INRA-Versailles).

Au niveau européen, deux grands instituts développent des approches de génétique moléculaire très en pointe dans le domaine des protéagineux : le Department of Applied Genetics du JIC-Norwich, (GB) et le laboratoire de Génétique moléculaire de l'IPK-Gatersleben (Allemagne). Ces deux instituts focalisent leurs études sur les éléments du génome qui contrôlent le développement de la graine et la composition de ses principaux constituants (protéines, amidon,  $\alpha$ -galactosides). Certains travaux sont financés par des industriels.

Dans le monde, l'équipe de T.J. Higgins (Australie) semble développer le plus ambitieux programme d'ingénierie génétique dans lequel les légumineuses, notamment le pois et le lupin, sont les cibles. Dans ce programme, différents aspects de la production sont pris en

compte et notamment l'accumulation de protéines riches en soufre. L'équipe de A. Russel (Nouvelle Zélande) développe un programme analogue d'amélioration du pois. Au Canada, l'un des principaux producteurs mondiaux de pois ou cette production est très soutenue, 2 sites sont consacrés à des études sur le pois : le Morden Research Centre et une chaire de l'université de Saskatchewan. Aux USA, F. Muehlbauer et N. Weeden développent des programmes de génétique moléculaire en vue de l'amélioration du pois, mais ces programmes restent cependant beaucoup moins importants que ceux consacrés aux oléagineux et aux céréales. Sur le soja, l'Université de Purdue (USA) a engagé des programmes importants sur la transformation du soja et les processus de maturation des protéines de réserve (expression, modification post-traductionnelle, routage) de manière à maîtriser les étapes de la biosynthèse. Les approches de type QTL restent rares : Brummer (USA) a recherché des QTL de teneur en huile et en protéines chez le soja.

#### ◆ **Commentaires et Perspectives**

Rendements élevés et hautes teneurs en protéines des graines apparaissent souvent antinomiques pour un génotype donné. La sélection des 30 dernières années a porté essentiellement sur le développement de variétés plus productives, plus faciles à récolter et ne contenant pas de tannins ou de facteurs anti-nutritionnels. L'augmentation de rendement a été significative (+20 qx/ha en 20 ans) et s'est accompagnée d'une augmentation de la taille de la graine. La recherche d'une augmentation de rendement revient probablement à sélectionner chez le pois les plantes pour lesquelles la voie de biosynthèse de l'amidon (la principale réserve de la graine) et/ou le transit des assimilats sont optimisés. En revanche, l'efficacité de la remobilisation de l'azote agissant probablement peu sur le rendement, ce caractère n'a pas été sélectionné (cf. ECLAIR). Pour limiter cette évolution, le CTPS a introduit depuis 1997 un critère de teneur en protéines minimale des graines pour toute nouvelle variété inscrite au catalogue.

Que ce soit pour l'amidon, les parois végétales ou les protéines, une meilleure connaissance du contrôle des voies de biosynthèse est indispensable pour la maîtrise de la composition des graines. Faire varier à dessein le rapport amylose/amylopectine et le degré de cristallinité de l'amidon, la composition et l'organisation des parois végétales ou la composition en protéines représente un enjeu considérable nécessaire pour répondre tant aux objectifs de l'alimentation animale qu'à ceux de l'industrie du fractionnement pour l'alimentation humaine. Une bonne connaissance de la régulation de l'expression des gènes impliqués (utilisant le développement de la génomique sur pois et espèces modèles) et une technique de transgénèse robuste sont les éléments nécessaires à cet objectif.

Les techniques d'amélioration des plantes vont probablement évoluer vers des approches de plus en plus fondées sur les biotechnologies : sélection assistée par marqueurs ou transformation génétique. Les méthodes de transformation génétique pour les légumineuses à grosses graines actuellement disponibles en France et dans les pays développés (GB, Australie, Allemagne, Canada, USA) sont opérationnelles mais longues et d'un rendement très faible, et donc coûteuses à mettre en œuvre.

*Cependant, c'est l'absence de fragment d'ADN (QTL ou gène) à sélectionner ou à manipuler qui constitue le principal obstacle à leur utilisation pour l'amélioration de caractères multifactoriels tels que le rendement ou la composition protéique des graines. Nos connaissances au niveau moléculaire des processus impliqués dans ces caractères sont très insuffisantes.*

La recherche française présente un dispositif très bien intégré, du gène à la plante en peuplement, capable de fournir des résultats aussi bien au niveau de l'identification de gènes intéressants impliqués dans le remplissage des graines, que de la compréhension de la variabilité génétique et environnementale de la composition de la graine.

- **A court terme**

L'objectif de l'amélioration génétique des protéagineux concerne actuellement en France l'augmentation de leur teneur globale en protéines. Les exigences sont différentes selon la destination de l'aliment. La production de graines ayant une composition protéique plus homogène est aussi recherchée car elle permettrait des utilisations industrielles mieux maîtrisées et simplifierait considérablement les procédés d'extraction et de fractionnement. Cette amélioration de la teneur en protéines est engagée à différents niveaux, l'un consistant à évaluer et mettre en œuvre la variabilité génétique importante existant pour ce caractère dans l'espèce, l'autre consistant à minimiser les constituants non digestibles, tels que les celluloses, pectines et hémicelluloses des parois cellulaires en particulier. Différentes approches sont en cours pour exploiter ces voies, l'objectif étant d'accroître la qualité de la graine tout en maintenant le potentiel de production de la plante, ce qui semble aujourd'hui possible comme l'indiquent les dernières variétés inscrites au Catalogue du CTPS.

Le pari sur l'amélioration de la balance en acides aminés essentiels (en particulier en acides aminés soufrés et en tryptophane pour le pois) est quant à lui compliqué par l'évolution des méthodes de synthèse d'acides aminés industriels, dont les coûts de commercialisation diminuent très significativement, en particulier pour la lysine et la méthionine, et à court terme également pour le tryptophane. Ce critère pourrait néanmoins apparaître plus important dans un contexte où la composition en acides aminés serait mieux équilibrée dans les nouvelles variétés de soja et dans le cas du développement de la production d'aliments biologiques riches en protéines destinés à l'alimentation humaine.

- **A long terme**

Le progrès des connaissances dans le domaine de l'élaboration de la graine et du contrôle de sa composition permettent de penser que la transformation génétique directe sera de plus en plus utilisée pour maintenir la compétitivité de la culture de pois et des autres légumineuses de pays tempérés. Outre les améliorations dans le domaine de l'alimentation animale que cette technologie permettra, on peut espérer qu'elle permettra également d'adapter le pois à la production de matières premières destinées à des usages industriels, alimentaires ou non alimentaires. Cette diversification (fibres, isolats de protéines, amidons à teneurs en amylose et en amylopectine particulières) qui apparaît comme un facteur essentiel dans le développement d'une production aujourd'hui fragilisée par les aléas du marché, reste cependant limitée car elle repose sur un marché étroit (fibres, isolats de protéines), ou déjà occupé par des matières premières d'une autre origine (céréales, pomme de terre dans le cas de l'amidon par exemple). Le préalable au développement de ces utilisations industrielles est d'assurer une plus forte compétitivité via une augmentation du rendement ou via une meilleure adaptation des matières premières aux procédés de fractionnement ou encore via la spécificité des produits offerts en agissant sur les propriétés fonctionnelles des réserves de la graine.

La production de produits à haute valeur ajoutée (vaccins, enzymes industrielles) après transformation génétique est commencée dans plusieurs organismes (CSIRO, IPK par exemple), cependant les surfaces emblavées seront toujours marginales pour ce type de production. Un autre exemple est constitué par le programme européen PHASTICS dont le but est de faire produire des PHA (polyhydroxyalcanoates, une matière première utilisable pour fabriquer des matières plastiques biodégradables) à des mutants de pois sans amidon. La faisabilité de cette approche n'est cependant pas encore démontrée.

### ◆ **Références Bibliographiques**

- ✓ AEP (Ed.), 1998. Opportunities for high quality, healthy and added value crops to meet European demands. Proceedings of the 3<sup>rd</sup> European Conference on grain legumes. Valladolid (SP), 14-19 Novembre 1998. 513pp
- ✓ Buleon A., Colonna P., Planchot V., Ball S., 1998. *Int. J. Biol. Macromol.* **23**: 85-112.
- ✓ Boulter D and Croy RRD, 1997, The structure and biosynthesis of Legume seed storage proteins: A biological solution to the storage of nitrogen in seeds, *Advances in Botanical Research*, 27 : 1-84.
- ✓ Casey R. & Davies D. R. (Eds.), 1993. *Peas : Genetics, Molecular Biology and Biotechnology*. CAB International, Wallingford (UK), 323 pp. ISBN 0 85198 863 6
- ✓ Gueguen J., Cerletti P., 1994. Legume seeds proteins. In "New and developing sources of food proteins". Ed. B.J.F. Hudson. Chapman & Hall, London, 6, 145-193.
- ✓ Molvig L. et al., 1997. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94 : 8393-8398
- ✓ Reidt et al., 2000. *Plant J.*, 21 : 401-408
- ✓ Shewry, P.R., 1995. Plant storage Proteins. *Biol. Rev.*, 70 : 375-426.

### ◆ **Adresses des laboratoires connus**

#### • *Etrangers*

- ✓ Chair in Pulse Crops, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada
- ✓ Cornell University, Geneva, USA (N. Weeden)
- ✓ Crop & Food Research, Christchurch, Nouvelle Zélande (A. Russel)
- ✓ CSIRO, Canberra, Australie (T. J. Higgins)
- ✓ Department of Agronomy, Iowa State University, Ames, USA (Brummer)
- ✓ Department of Applied Genetics, JIC-Norwich, UK, (R. Casey)
- ✓ Department of Crop and Soil Science, Washington State University, Pullman, USA (F. Muehlbauer)
- ✓ Laboratoire de Génétique moléculaire, IPK-Gatersleben, DE (U. Wobus)
- ✓ Morden Research Centre, Manitoba, Canada
- ✓ University of Purdue, West-Lafayette, Indiana, USA

#### • *France*

- ✓ INRA GAP, Dijon
- ✓ INRA Unité de Malherbologie-Agronomie, Dijon
- ✓ INRA Unité de Biochimie et Technologie des Protéines, Nantes
- ✓ INRA Unité de Recherche sur les Polysaccharides, leurs Organisations et Interactions, Nantes
- ✓ INRA Laboratoire de Biologie des Semences, Versailles
- ✓ INRA Unité de Nutrition Azotée des plantes Plantes, Versailles
- ✓ INRA GAP-Versailles (G. Pelletier)
- ✓ CNRS ISV-Gif/Yvette (P. Ratet, J. Giraudat)

### ◆ **Sites Web consultés**

- ✓ <http://css.wsu.edu/faculty.htm>
- ✓ <http://res2.agr.ca/winnipeg/pulsback.htm>
- ✓ <http://www.biochem.purdue.edu/~plantbiology/faculty/Nielsen.html>
- ✓ <http://www.crop.cri.nz/>
- ✓ <http://www.ipk-gatersleben.de/>
- ✓ <http://www.jic.bbsrc.ac.uk/science/index.htm>
- ✓ <http://www.pi.csiro.au/HomePage.htm>
- ✓ <http://www.nysaes.cornell.edu/hort/breeders/peas.html>
- ✓ [http://www.usask.ca/research/ag\\_chair.shtml](http://www.usask.ca/research/ag_chair.shtml)

## 4.2. Semences et qualité germinative

### ◆ *Enjeux*

La semence est le vecteur du progrès génétique, qu'il soit d'ordre agronomique ou technologique. Pour cette diffusion, *la qualité des semences est primordiale non seulement sur le plan génétique (pureté variétale) mais aussi pour les aspects sanitaire et physiologique (qualité germinative)*. Des travaux d'ordre plus méthodologiques sont alors nécessaires pour mesurer et garantir ces qualités.

*La qualité sanitaire des semences* est un facteur important pour le développement ultérieur de la culture. Les principales maladies transmises par les semences recherchées sur les protéagineux sont l'antracnose (pois, féverole, lupin), la grasse (*Pseudomonas syringae pv pisi*) et le Pea Seed Borne Mosaic Virus chez le pois, ainsi que le *Diaporthe phaseolorum* et *Pseudomonas syringae pv glycinea* sur soja.

Des méthodes de détection existent pour ces pathogènes, même si des harmonisations de méthodes sont en cours sur le *Diaporthe* du soja par exemple.

Il n'existe pas de seuil de contamination officiellement fixé sur ces maladies, excepté pour les semences de soja soumises à la certification.

Les recherches menées en matière de qualité sanitaire des semences visent d'une part à créer des variétés résistantes à ces maladies (travail de l'INRA pour la résistance du pois à l'*Ascochyta* et les travaux conduits par les firmes privées sur la résistance du pois à la grasse) et d'autre part à conduire des itinéraires culturaux visant à produire des semences saines (travaux menés conjointement par la FNAMS, l'ITCF et l'INRA).

*La qualité physiologique des semences est un facteur essentiel de la certification des lots de semences*. En France, le marché des semences protéagineuses (pois, féverole, lupin) couvre près de 94 000 tonnes en production de semences certifiées (selon le GNIS : groupement national interprofessionnel des semences et plants). *Le marché français est autosuffisant et consomme la quasi totalité (94 %) de sa production de semences (4 % d'exportations)*, représentée essentiellement par du pois de printemps (96 % de la production). Pour un génotype donné, la qualité physiologique (germination, vigueur, aptitude à la conservation, ...) se met en place au cours du développement des semences sur le porte-graines. Cette étape clé détermine le comportement des semences lors des opérations industrielles ultérieures (triage, conditionnement, traitements, ...) puis au moment du semis. Elle fait donc l'objet *de nombreuses études via l'écophysiologie des porte-graines*.

*Un second axe de recherche a trait à la technologie des semences* où ces dernières sont considérées comme l'intrant indispensable à une bonne implantation des cultures. Enfin, en attendant de disposer de marqueurs moléculaires de la qualité germinative, des outils de mesure continuent d'être développés sur un plan plus technique en lien avec la levée au champ.

### ELABORATION DE LA QUALITE SUR LE PORTE-GRAINES

#### ◆ *Résultats acquis par la recherche*

En matière d'écophysiologie des porte-graines, les principaux travaux réalisés concernent les légumineuses à grosses graines dont le pois, pour lesquelles on constate une forte variabilité de la qualité des lots du fait d'une floraison séquentielle.

Le problème majeur des semences protéagineuses (pois, soja) a trait à leur fragilité. Dès la fin des années 80, des travaux ont montré que la teneur en eau des semences à la récolte joue un

rôle essentiel pour limiter les dégâts mécaniques chez ces semences (l'optimum se situe vers 18 % d'eau). Des travaux plus récents conduits sur pois à la FNAMS ont montré que l'alimentation hydrique des porte-graines peut aussi contribuer à diminuer cette fragilité (Fougereux, 1994).

#### ♦ **Recherches en cours**

Il s'agit actuellement de transférer les résultats de la recherche aux conditions de production. Les travaux à la FNAMS sont ainsi entrés dans une phase d'application à grande échelle d'un pilotage de l'irrigation pour vérifier l'origine de la qualité des semences de pois en production. Des travaux d'ordre technique sont également menés en association avec l'ITCF et l'INRA du Rheu, afin de comprendre l'origine des défauts de qualité sanitaire des semences de pois et de féverole.

#### ♦ **Références bibliographiques**

- ✓ Fougereux J.A. (1994) – Etat de l'influence de l'alimentation hydrique du porte-graine sur la qualité germinative des semences de pois protéagineux (*Pisum sativum* L.). Thèse doctorat de l'INA Paris-Grignon, 174 p.
- ✓ McCarty D.R. (1995) – Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 46, 71-93.

#### ♦ **Laboratoires connus**

FNAMS-Labosem., 49 800 Brain sur l'Authion, [f.ladonne.fnams@wanadoo.fr](mailto:f.ladonne.fnams@wanadoo.fr)

## TECHNOLOGIE DES SEMENCES

#### ♦ **Résultats acquis par la recherche**

*Le traitement phytosanitaire des semences est devenu une étape incontournable de la production de semences certifiées.*

L'application de fongicides et d'insecticides sur les semences au moment de l'implantation des cultures au champ permet de les protéger au cours des premiers stades de la germination et du développement des plantules. De même des traitements physiologiques (priming) ou hormonaux, développés sur d'autres espèces, sont disponibles pour écourter les premières phases de germination et favoriser une levée rapide et homogène.

#### ♦ **Recherches en cours**

Depuis quelques années, on voit se développer de nouvelles molécules chimiques très performantes sur le plan de l'efficacité mais qui font parfois preuve de défaut de sélectivité, notamment lorsqu'elles sont appliquées en association. C'est pourquoi, il est nécessaire d'étudier en parallèle à la sortie de ces traitements, l'origine de la sensibilité des lots de semences aux traitements phytosanitaires. Ces aspects font l'objet d'un programme auprès du C.T.P.S. (Comité Technique Permanent de la Sélection) sur « L'incidence de l'état physiologique des semences de pois sur leur comportement vis-à-vis des traitements de semences » pour la période 1997/2000. Ce contrat associe en partenariat la FNAMS, la SNES, l'Université de Nice, le GNIS et le Laboratoire LARA. L'objectif de l'étude est d'identifier

les états physiologiques des semences de pois conduisant à des sensibilités différentes vis-à-vis des produits de traitement.

Le priming, quant à lui est développé sur pois pour pallier les dégâts d'imbibition liés à des teneurs en eau trop basses ou pour réparer les dégâts cellulaires liés au vieillissement des semences (Sivritepe et *al.*, 1995). Le recours à des outils tels la RMN (résonance magnétique nucléaire) utilisés sur semences de pois permet d'affiner les connaissances sur l'état hydrique des semences et sur leur imbibition (Franconi et *al.*, 1999).

#### ♦ **Références bibliographiques**

✓ Franconi F., Pouliquen D., Wagner M.H., Ducournau S., Ladonne F., Demilly D., Léchappé J. (1999) – Contribution of MR mini-imaging to the study of imbibition in pea seeds : relationship with seed germination. *MAGMA* 8 (suppl.1), 203-204.

✓ Sivritepe H.O., Dourado A.M. (1995) – The effect of priming treatments on the viability and accumulation of chromosomal damage in aged pea seeds. *Annals of Botany* 75 (2), 165-171.

### MESURE DE LA QUALITE GERMINATIVE

#### ♦ **Résultats acquis par la recherche**

Les essais de germination développés pour mesurer la qualité germinative découlent des conditions environnementales décrites par les physiologistes. Des tests standards ont été développés; ils utilisent les optima pour les besoins en eau et en température ce qui leur permet d'être à la fois fiables et reproductibles. Mais il sont parfois insuffisants pour prendre en compte l'expression de la qualité physiologique dans les conditions de culture en champ.

#### ♦ **Recherches en cours**

Des travaux d'ordre méthodologique sont développés en vue d'une caractérisation fiable de la qualité des lots de semences de pois (développement de tests en conditions sub-optimales comme le test au froid, standardisation de tests biochimiques comme la conductimétrie, ...), au stade de la commercialisation au GEVES (SNES, Angers) et en cours de culture à la FNAMS (Labosem, Brain sur l'Authion).

La standardisation de tests de vigueur s'effectue à l'échelle internationale, au sein de l'Association internationale des essais de semences (I.S.T.A. : International Seed Testing Association), via un comité technique (Vigour Test Committee).

Le soja, aussi bien que le pois font l'objet de comparaisons de tests en laboratoire sur un grand nombre de lots ou de variétés en vue d'une prédiction fiable de la levée au champ lorsque les conditions de semis sont sub-optimales (Universités du Kentucky, USA ; d'Aberdeen, Ecosse ; Sao Paulo, Brésil ; Frederiksberg, Danemark).

#### ♦ **Références bibliographiques**

✓ Hampton J.G., Tekrony D.M. (1993) – Handbook of vigour test methods. I.S.T.A., 3<sup>rd</sup> edition, Zurich, 117 p.

✓ Powell A.A., Ferguson A.J., Matthews S. (1997) – Identification of vigour differences among combining pea (*Pisum sativum*) seed lots. *Seed Science and Technology* 25, 443-464.

◆ **Laboratoires connus**

- ✓ ESALQ/Universidade de Sao Paulo, Dept de Agricultura, 13418-900 Piracicaba, SP, Brazil. J. Marcos-Filho.
- ✓ FNAMS-Labosem, 49 800 Brain sur l'Authion. (Fabienne Ladonne), [f.ladonne.fnams@wanadoo.fr](mailto:f.ladonne.fnams@wanadoo.fr)
- ✓ GEVES-SNES, 49 071 Beaucouzé Cedex. Sylvie Ducournau, [sylvie.ducournau@geves.fr](mailto:sylvie.ducournau@geves.fr)
- ✓ University of Aberdeen, Department of Agriculture, Aberdeen, Scotland. Alison Powell, [a.a.powell@abdn.ac.uk](mailto:a.a.powell@abdn.ac.uk)
- ✓ University of Kentucky, Department of Agronomy, Lexington, KY 40546-0091. Dennis Tekrony, [dtekrony@ca.uky.edu](mailto:dtekrony@ca.uky.edu)

◆ **Commentaires et perspectives**

La qualité sanitaire des semences de pois est un facteur important dans l'évolution de la culture. Si l'INRA reste encore impliqué dans des programmes de sélection de variétés résistantes aux maladies, l'Institut ne réalise plus à l'heure actuelle de détection des maladies transmises par les semences. Ce travail est réalisé presque entièrement par la Station Nationale d'Essais de Semences du GEVES au niveau national.

*La qualité sanitaire risque de devenir un élément encore plus important si des systèmes de productions de semences biologiques se développent*; toutefois, cette tendance reste encore assez limitée dans le cas du pois comparativement aux céréales et aux potagères par exemple.

Les espèces protéagineuses sont étudiées au niveau du développement des graines en vue de leur utilisation industrielle plus que pour leur utilisation en tant que semences. Or la séparation entre la fin du développement (maturation) et la germination semble étroite (McCarty, 1995), comme le montrent les études portant sur les gènes ou les protéines LEA (late embryogenesis-abundant). *Cette transition reste à étudier et sera sans doute favorisée par le développement de la génomique fonctionnelle.*

*Le regroupement des entreprises semencières ne favorise pas la recherche en matière de technologie des semences pour les espèces protéagineuses.* Elles subissent en effet la concurrence des autres espèces de grandes cultures pour lesquelles le marché est plus vaste ou celle des espèces à forte valeur ajoutée (potagères).

Les remontées de ce secteur privé au niveau de l'interprofession ne permettent donc pas de bâtir des projets d'envergure mais plutôt des études au cas par cas comme cela se fait actuellement sur la sensibilité des lots de pois aux traitements de semences.

Enfin, les outils de mesure de la qualité germinative méritent toujours d'être affinés. Un paradoxe réside, en effet, dans le fait que pour connaître le potentiel de germination d'un lot, il faut le faire germer. Les voies de recherche axées sur la biologie moléculaire en germination pourront à moyen ou long terme permettre de dépasser cette ambiguïté avec *l'obtention de marqueurs de qualité germinative.*

### 4.3 Propriétés nutritionnelles et utilisation en Alimentation animale

#### ◆ Enjeux

*Les enjeux de l'utilisation des protéagineux sont à la fois économique, dans le contexte d'importation des protéines de soja, environnemental à cause des rejets azotés potentiels et nutritionnel à cause de la digestibilité encore trop faible de ces protéines et de leur composition déséquilibrée en acides aminés (acides aminés soufrés et tryptophane),.*

Les recherches sur l'utilisation des graines protéagineuses (pois, féverole, lupin) ont été entreprises, il y a une trentaine d'années, dans le but de concurrencer l'utilisation du tourteau de soja et de réduire ainsi la part des sources de protéines importées dans les aliments composés. Avec la programmation d'une sensible baisse du différentiel des aides à l'hectare entre les protéagineux et les céréales, c'est l'augmentation des rendements culturaux des premiers relativement à celui des seconds et le maintien de prix élevés, justifié par l'amélioration des valeurs nutritionnelles, qui déterminent l'avenir des espèces de graines protéagineuses et plus particulièrement leur utilisation en alimentation animale. Toutefois, les impératifs socio-économiques actuels entrent également en jeu dans la valorisation des protéagineux. Conséquence des préoccupations de sécurité alimentaire du consommateur, *la tendance actuelle, favorable aux protéagineux, encourage l'utilisation des protéines végétales aux dépens des protéines animales (farines de viande) aussi bien chez les monogastriques que chez les ruminants. A l'inverse, les soucis du citoyen quant à la préservation de l'environnement imposent de réduire les rejets azotés et donc de limiter l'apport de protéines dans les rations ; ceci peut constituer un handicap pour les protéagineux si la digestibilité des protéines n'est pas suffisante. De plus, avec la suppression des additifs de type antibiotique dans les rations, les utilisateurs sont très attentifs à la qualité sanitaire des matières premières et aux propriétés physiopathologiques propres de certains constituants.*

Dans ce contexte, la simple possibilité de prédire la valeur alimentaire d'une matière première est déjà un facteur favorable à son utilisation raisonnée en alimentation animale. La valeur alimentaire se décline aujourd'hui non seulement en termes de *valeur énergétique* et de *valeur protéique ou azotée*, mais aussi de plus en plus en terme de valeur sanitaire. *La valeur sanitaire est un domaine de recherche interdisciplinaire relativement nouveau, mais de la plus haute importance pour l'amont de la filière comme pour l'utilisateur.*

#### ▪ *Enjeux liés à la valeur énergétique: la référence aux céréales*

Les céréales sont l'aliment énergétique de base des animaux monogastriques (porc et volailles). Cependant, il est nécessaire de compléter l'apport d'azote et d'acides aminés essentiels des céréales par l'incorporation dans les rations de sources de protéines riches en lysine, l'acide aminé essentiel le plus limitant, et en certains autres acides aminés essentiels. Cette complémentation est en général assurée par les tourteaux d'oléagineux et les farines de protéagineux. Les graines protéagineuses les plus utilisées (pois, féverole, lupin) présentent une teneur en protéines, et plus particulièrement en lysine, intermédiaire entre celles des céréales et du tourteau de soja. *En conséquence, si le différentiel de prix entre les céréales et le soja n'est pas suffisant, les protéagineux à basse teneur en protéines sortiront d'autant plus facilement de la formule, que leur valeur énergétique sera plus faible.* Cela se fera au profit des céréales.

Au cours des dernières années, la conjonction de deux événements a plutôt accentué le handicap des protéagineux. D'abord, le développement des acides aminés industriels a permis

de limiter l'incorporation dans les rations de matières premières riches en protéines, y compris du tourteau de soja, en autorisant une meilleure valorisation de l'énergie des céréales. Plus récemment, on a encouragé la réduction de teneurs en protéines des aliments, permise par cette technique, au titre de la réduction des rejets azotés (normes CORPEN<sup>1</sup>). *Ainsi, une bonne valeur énergétique demeure une qualité essentielle requise pour l'utilisation de ces matières premières.* Il est donc particulièrement important de bien maîtriser les facteurs affectant la valeur énergétique.

Chez le monogastrique, l'énergie digestible est influencée positivement par les teneurs en amidon et en protéines. La digestion de l'amidon produit du glucose très facilement absorbé dans l'intestin grêle. Les nutritionnistes ont démontré que l'utilisation nette de l'énergie des acides aminés issus de la digestion des protéines, qu'ils servent à la synthèse des protéines corporelles ou qu'ils soient catabolisés pour produire de l'ATP, est beaucoup moins bonne que l'utilisation nette de l'amidon. En conséquence, du fait de leur plus grande richesse en amidon, les céréales présenteront toujours une supériorité sur les protéagineux en termes d'énergie nette. Par ailleurs, les teneurs en constituants pariétaux (parois cellulaires végétales) sont corrélées négativement aux teneurs en amidon (cas du pois selon Bastianelli et al, 1998). Chez le monogastrique, leur utilisation digestive passe par une dégradation microbienne dans le gros intestin. Celle-ci est parfois très incomplète, notamment lorsque les constituants sont insolubles, particulièrement chez les volailles, et elle aboutit à la production d'acides gras volatils dont l'utilisation nette est moins bonne que celle du glucose. De plus, indépendamment de leur composition et de leur dégradabilité dans le gros intestin, les parois cellulaires constituent souvent une barrière limitant l'accessibilité de l'amidon et des protéines aux enzymes. *L'enjeu est donc d'accroître l'énergie nette des protéagineux en optimisant la balance protéine / amidon) et en limitant la teneur en glucides pariétaux.*

Chez le ruminant, les valeurs énergétiques nettes des aliments concentrés (UFV ou UFL<sup>2</sup>) ne sont pas pondérées systématiquement par la prise en compte de la teneur en protéines. Cette valeur énergétique semble élevée et ne pose pas de problème majeur.

▪ *Enjeux liés à la valeur azotée: la référence au tourteau de soja*

Les protéagineux plus riches en protéines, et donc moins riches en énergie nette, seront d'autant plus facilement supplantés par le tourteau de soja que la valeur de leurs protéines sera plus faible. Ainsi, *pour favoriser l'incorporation des graines protéagineuses dans les rations de monogastriques, il ne suffit pas d'augmenter la teneur en protéines de la graine, encore faut-il que celles-ci soient bien équilibrées en acides aminés essentiels disponibles.* En terme de composition en acides aminés, les protéagineux se comparent assez bien au soja. Si l'on excepte le lupin, ils sont parfois plus riches en lysine que le soja mais, comme lui, ils sont tous relativement déficitaires en acides aminés soufrés. Toutefois, la protéine de soja est riche en tryptophane, l'autre facteur limitant des protéagineux européens. On évalue encore mal l'impact qu'aura la mise sur le marché de L-tryptophane industriel sur la valorisation des protéagineux.

Chez les animaux monogastriques, on estime la disponibilité des acides aminés dans les protéines en mesurant leur digestibilité dans l'intestin grêle (digestibilité iléale des acides aminés). Or, il est clair que les protéines de tourteaux de soja sont les protéines végétales présentant la meilleure digestibilité iléale pour la plupart des acides aminés. Toutefois, il faut rappeler qu'il s'agit d'une matière première élaborée ayant subi des traitements mécaniques et un toastage au cours de la trituration des graines. En inactivant les facteurs antinutritionnels de la graine et en dénaturant de manière contrôlée les protéines, ces traitements contribuent à

<sup>1</sup>

<sup>2</sup> UFV Unité Fourragère Viande, UFL, Unité Fourragère Lait

accroître la valeur nutritionnelle du tourteau de soja. À l'inverse, les graines protéagineuses ne subissent généralement pas de traitement Or on sait (i) que les digestibilités réelles de certaines protéines de ces graines (albumines, et même certaines globulines) sont améliorées par un traitement thermique et (ii) que le broyage préalable à l'incorporation dans les rations est un élément déterminant de la valeur nutritionnelle. Les graines de protéagineux devraient donc en toute rigueur être comparée au tourteau de soja après traitements mécanique et thermique. Les traitements thermiques, étant coûteux, *il paraît très important d'optimiser la composition protéique de la graine sur la base des relations entre le profil protéique (proportion relative des différents types de protéines) et la valeur azotée.*

Un dernier aspect nouvellement pris en compte de la valeur azotée des matières premières pour les monogastriques est la *contribution des pertes endogènes à la fraction protéique apparemment indigestible*. La mauvaise digestibilité apparente d'une protéine peut être due soit à leur faible dégradabilité dans le tractus digestif soit à une stimulation des pertes endogènes. Or, cette perte endogène a un coût métabolique affectant directement le bilan des acides aminés disponibles pour la croissance ou les productions. On situe encore mal les diverses matières premières les unes par rapport aux autres sur ce critère. *Il est important pour des raisons nutritionnelles et d'impact environnemental de mieux contrôler ces pertes.* On en connaît mal les facteurs de variation bien que l'on sache que certains facteurs antinutritionnels et les polysaccharides non amylacés peuvent être impliqués.

#### ▪ *Enjeux liés à la valeur sanitaire*

Plusieurs problèmes sanitaires d'ordre digestif sont spécifiques de l'utilisation des graines protéagineuses. Ces problèmes ont le plus souvent été associés aux différents facteurs antinutritionnels (facteur antitrypsique, lectines, oligosaccharides, alcaloïdes et substances toxiques diverses). Toutefois, les macro-constituants (protéines, polysaccharides non amylacés (PNA), amidon résistant) et leurs propriétés sont de plus en plus importants à considérer dans cette thématique. Les solutions sont soit génétiques, soit technologiques, l'applicabilité des secondes étant, bien entendu, limitée par leurs coûts.

#### ◆ *Résultats acquis par la recherche*

##### • *La Valeur énergétique*

###### ▪ *Chez le porc*

La valeur énergétique du pois a fait l'objet d'un nombre important de mesures du contenu en énergie digestible (ED) à l'INRA entre 1975 et 1990. Il apparaissait alors une différence significative de digestibilité de l'énergie, en relation avec leurs teneurs respectives en tannins, entre les pois à fleurs colorées et les pois à fleurs blanches (81.6 vs. 87.7 soit 3.62 vs. 3.89 kcal ED/kg MS). Parmi ces derniers, on observait une légère différence entre les pois de printemps et les pois d'hiver (88.7 vs. 86.6 soit 3.93 vs. 3.84 Mcal ED/kg MS, respectivement, n = 12) liée peut-être à une composition glucidique plus favorable (plus d'amidon, moins de fibres). *Il est intéressant de noter que dès cette époque, un consensus se dégagait au niveau de la littérature européenne pour préférer les pois de printemps au pois d'hiver . L'argument d'une teneur en ED se rapprochant de celle du maïs, la céréale la plus énergétique, avec une variabilité relativement faible selon la variété (3.77 à 4.10, écart-type 3.3%) était mis en avant.* Ces résultats ont été largement confirmés par l'ITCF dans un projet européen ECLAIR coordonné par l'UNIP (PEA) (pois lisses à fleurs colorées 3.60 Mcal ED/kg MS, n = 6, étendue 3.48 à 3.72, écart-type 2.5 %; pois lisses à fleurs blanches 3.90 Mcal ED/kg MS, étendue 3.69 à 4.14, écart-type 3.0 %), n = 23. Dans cette étude, les pois ridés à fleurs

blanches présentait une valeur intermédiaire (3.76 Mcal ED/kg MS étendue 3.51 à 3.89, écart-type 3.7 %), malgré une teneur en fibres nettement plus élevée, notamment dans les cotylédons.

C'est probablement en raison d'une très bonne utilisation des polysaccharides non amylacés (PNA) dans le gros intestin que la valeur énergétique du pois est aussi élevée chez le porc. Ceci explique qu'il est difficile de mettre en relation les variations de valeur énergétique avec les teneurs en amidon ou en PNA. Il semble que la teneur en tannins soit bien corrélée à la valeur énergétique, y compris pour les pois fourragers à fleurs blanches (Grosjean et al 1998). En définitive, il est révélateur de la bonne valeur énergétique du pois que le rapport ED<sup>3</sup> pois/blé soit d'au moins 1. C'est seulement en terme de valeurs énergétique nette (EN) que le blé exprime sa supériorité, le rapport EN pois/blé étant de 0.91 (Noblet et al 1989), surtout du fait de la teneur en protéines plus élevée du pois. Toutefois, le rapport soja/blé est encore plus diminué dans le système d'évaluation de l'EN utilisé en France par rapport à sa valeur dans le système ED (0.66 versus 1). ***La bonne valeur énergétique nette du pois est donc la principale explication de l'engouement des formulateurs français pour le pois en alimentation porcine.*** Ceci n'est pas vrai dans tous les pays européens, notamment les pays nordiques. ***Malgré tout, la variabilité de valeur énergétique entre lots de pois d'une même variété pose encore problème*** car on ne peut pas plus prédire la valeur ED que la valeur EN par les teneurs en constituants alimentaires classiquement analysés (Grosjean et al 1998b).

*Les données concernant les effets de traitements technologiques sont très fragmentaires voire inexistantes (broyage/granulométrie) chez le porc.* L'amélioration observée avec le pressage en granulés est peu significative (Grosjean et al, 1989), probablement aussi en raison de l'efficacité de la digestion dans le gros intestin. De même, le toastage du pois, n'affecte pas plus la digestibilité des PNA que celle de l'amidon, ni dans l'intestin grêle ni dans le gros intestin (Bach Knudsen, 2000, non publié, Link Feed workshop, Bruxelles).

La féverole présente pour le porc une valeur ED relativement plus faible que le pois (3.78 ± 0.10 Mcal/kg MS) pour les variétés à fleurs colorées qu'elles soient d'hiver ou de printemps (Bourdon et Perez 1992). Le décorticage améliore significativement cette valeur énergétique (4.07 vs. 3.80). Les données les plus récentes (féveroles 0-vicine-convicine testées par Grosjean et al 2001) montrent une amélioration de la valeur ED avec le développement des variétés sans tannins. Mais il semble que les facteurs limitant la valeur énergétique soient à rechercher au moins autant dans la nature des PNA que dans la présence de tannins. La valeur ED des féveroles est assez proche de celle du tourteau de soja. Toutefois, son taux de protéines étant intermédiaire entre celui du pois et du tourteau de soja, la féverole garde sur ce dernier un avantage en termes d'EN.

Deux types de lupin ont été considérés, le lupin blanc (*Lupinus Albus*) pour son intérêt agronomique (forts rendements) sous nos climats et le lupin bleu (*Lupinus Angustifolius*), plus adapté à une production extensive en climat sec, pour son intérêt zootechnique. Les graines de lupin présentent la particularité d'être plus riches en protéines que les féveroles et de ne renfermer que très peu d'amidon et beaucoup de PNA. Malgré tout, on a pu mesurer dans le cas du lupin blanc des valeurs énergétiques étonnamment élevées (de l'ordre de 3.9 Mcal ED /kg MS selon Bourdon et al 1980). Malheureusement cette matière première est mal acceptée par les porcs, peut être en raison d'une certaine amertume (alcaloïdes) ou du fait de sa richesse en alpha-galactosides provoquant de la flatulence voire, accidentellement, une véritable

<sup>3</sup> ED, énergie digestible, EN énergie nette

météorisation. L'hypothèse d'une intolérance due à la présence de lectines doit semble-t-il être rejetée (données belges, Van Nevel et al, 2000) Le lupin bleu, caractérisé par une teneur plus faible en protéines, comparable à celle de la féverole, présente une valeur ED similaire à celle-ci (3.75 Mcal/kg MS pour la graine entière, 4.01 Mcal/kg MS pour la graine décortiquée selon Noblet et al 1998). Contrairement au lupin blanc, et malgré une teneur comparable en alpha-galactosides, il est bien accepté et on ne signale pas d'accidents du même type. Quoi qu'il en soit, dans les deux cas, la contribution des PNA, digérés en grande majorité dans le gros intestin, au contenu énergétique est élevée. *Des résultats récents (données australiennes de King et al, 2000), confirment d'ailleurs des valeurs ED acceptables pour les deux types de lupin, mais la valeur EN du lupin bleu est considérablement plus faible que celle du pois, et celle du lupin blanc est catastrophiquement basse. Ce dernier résultat s'explique sans doute par une stimulation très forte de la croissance des viscères, c'est à dire du foie et de l'ensemble du tractus digestif, et pas seulement du gros intestin.*

#### ▪ Chez les volailles

Jusqu'ici, le système EM (énergie métabolisable), proche du système ED, a été utilisé chez les volailles. Il est clair que comparée sur cette base, la valeur énergétique des protéagineux est nettement plus faible chez les volailles que chez le porc (2.9 vs 3.4 Mcal/kg MS). De plus, alors que chez le porc, le rapport EN pois/blé est de 0.91, le rapport EM pois/blé n'est que de 0.85, chez le poulet et la poule pondeuse (INRA 1989). En revanche, alors que le rapport EN soja/blé est de 0.66 chez le porc, le rapport EM soja/blé est de 0.77 chez les volailles. *Le pois est donc moins favorisé que chez le porc aussi bien vis à vis de la source énergétique de base (la céréale) que vis à vis de la source de protéines complémentaire concurrente (le soja).* Il s'ajoute à cela que la variabilité des données de valeur énergétique est plus forte chez les volailles que chez le porc, soit 3.6 % dans le cas des pois lisses à fleurs blanches, et 6.2 % dans le cas des pois lisses à fleurs colorées (Grosjean et al 1999). On retrouve comme chez le porc l'infériorité des graines de pois lisses à fleurs colorées en terme de valeur énergétique, comparativement au pois à fleurs blanches ; celle-ci ne peut être attribuée à une mauvaise digestibilité de l'amidon que dans le cas des pois ridés, non utilisés en alimentation animale, dont l'amidon est riche en amylose. Les teneurs en cellulose brute ou en téguments d'une part, et en amidon d'autre part, paraissent être les meilleurs facteurs prédictifs, respectivement en négatif et positif de l'EM des graines de pois à fleurs blanches. Une corrélation négative entre EM et facteur antitrypsique est montrée, mais ce ne serait qu'une conséquence de l'association étroite de ce facteur aux téguments des graines.

*La faible valeur énergétique des protéagineux a suscité des études sur les effets des modalités de préparation des aliments et notamment des traitements thermomécaniques (broyage et/ou pressage en présence ou non de vapeur). Chez les oiseaux, la valeur énergétique semble surtout dépendante de la digestibilité de l'amidon, les polysaccharides non amylacés étant peu dégradés, contrairement à ce qui est observé chez le porc. La digestibilité de l'amidon d'un pois broyé grossièrement n'est que de 76 %. Or, la digestibilité de l'amidon pur extrait de ce pois, corrigée pour l'endommagement causé par le broyage, reste élevée (93 %) même si elle est plus faible que celle de l'amidon de maïs témoin (Carré et al 1998). Un fractionnement des particules après broyage et décorticage des graines, montre que l'amidon des particules fines est nettement plus digestible que celui des particules grossières. Ces résultats suggèrent que le broyage permet surtout de détruire les parois des cellules cotylédonaires et de rendre l'amidon plus accessible aux enzymes digestives. De plus, il semble qu'à taille égale de particule, la digestibilité de l'amidon soit influencée directement par l'énergie mécanique mise en œuvre*

au cours du broyage, celle-ci augmentant lorsque le pois est humidifié. L'humidification augmente en effet la difficulté du broyage. La granulation, principalement via l'action mécanique du pressage, augmente systématiquement la valeur EM de la féverole et, dans une moindre mesure, celle du pois (Lacassagne et al 1988). L'effet est plus marqué lorsque la granulation est effectuée à sec. Dans le cas des pois lisses à fleurs blanches, la valeur énergétique moyenne augmente de 2.85 à 3.15 Mcal/kg de MS après granulation alors que la variabilité diminue de 4.3 à 2.2 %. Selon Carré (1997), les valeurs EM mesurées expérimentalement ne confirment les valeurs prédites par les équations générales de calcul de l'EM des matières premières que si l'aliment est granulé. En d'autres termes, ce n'est qu'après granulation que l'on atteindrait le potentiel énergétique théorique lié à la composition de la graine.

#### ▪ Chez les ruminants

La valeur énergétique du pois est considérée comme élevée. Mais, contrairement à ce qui est observé chez le monogastrique, elle n'est pas plus élevée que celle du soja (1.2 UFL/kg). En fait, c'est surtout vis-à-vis des sources de protéines de substitution concurrentes, tourteau de tournesol et tourteau de colza (0.8-0.9 UFL/kg), que les protéagineux sont bien placés. Contrairement à ce qui se passe pour les tourteaux, la forte dégradabilité des constituants du pois dans le rumen favorable à une excellente valeur énergétique dépend de la finesse de broyage. Or, la composition des particules varie considérablement en fonction de leurs tailles. La teneur en parois cellulaires est maximum dans la fraction grossière (>1mm) et diminue brutalement dans les fractions plus fines plus riches aussi bien en protéines qu'en amidon (Maaroufi et al 2000). Ces observations expliquent qu'une excellente valeur énergétique peut s'accompagner d'une moindre valeur des protéines du fait de leur dégradabilité excessive.

#### • *La Valeur protéique*

La notion de « valeur protéique » inclut celle de disponibilité des acides aminés, mesurée par la digestibilité iléale des protéines, mais aussi celle de l'équilibre des acides aminés disponibles.

#### ▪ Chez le porc

En comparant les variétés à fleurs colorées à celles à fleurs blanches, il est clair au seul vu de la digestibilité fécale de l'azote que *les tannins, contenus dans les téguments des graines, affectent négativement la digestibilité des protéines* (Bourdon et Pérez, 1992: 75.4 vs. 81.9; Grosjean et al 1998: 76.0 vs. 84.0). Cela vaut particulièrement pour les graines de féverole ; ainsi l'addition de coques de féverole riches en tannins à un régime réduit la digestibilité iléale des protéines en augmentant aussi bien les pertes endogènes que les pertes exogènes de protéines (Jansman et al 1993). Ces observations ont conduit à développer de nombreuses variétés pauvres en tannins pour le pois comme pour la féverole. Cependant la digestibilité fécale ou iléale des protéines de pois exempts de tannins, reste faible comparativement à celles du tourteau de soja toasté.

Il est très difficile de trouver une corrélation significative entre la digestibilité fécale des protéines et les teneurs en facteurs antitrypsiques ou en PNA (Gdala et al 1992; Grosjean et al 1998a). Néanmoins, lorsqu'on sélectionne des variétés sans tannins permettant de baliser une plage de variation suffisante (2 à 12 TIA) on met mieux en évidence l'effet dépressif du facteur antitrypsique que celui des PNA, sur la digestibilité iléale des acides aminés (lysine et surtout acides aminés soufrés et tryptophane) (Leterme et al 1990; Grosjean et al, 2000.

*Toutefois, même dans les pois disponibles actuellement (par exemple la variété Baccara), à faible teneur en antitrypsique, la digestibilité iléale des protéines reste inférieure à celle des protéines d'un tourteau de soja moyen, de 7 à 8 points, ce qui est important.*

Entre variétés, la variabilité de la digestibilité iléale des protéines atteint 6 %, alors qu'elle peut se réduire à 2.5 % entre lots d'une même variété évalués dans un même élevage (Grosjean et al 1998b). Mais, cette dernière variabilité résulte aussi bien des conditions de culture que des conditions d'élevage. Ainsi, certaines conditions de culture, notamment le caractère "séchant" de la parcelle ou l'absence d'irrigation tendent à réduire la digestibilité des protéines alors que la composition des graines n'est pas modifiée. D'autre part, on a montré récemment dans un test conjoint (ring-test) (Sève et al 2000) que, contrairement à celle d'un même tourteau de soja, la digestibilité des protéines d'un même lot de pois dépendait du site de mesure. *En d'autres termes, certaines conditions d'élevage (type de porcs et/ou environnement) pourraient révéler des différences importantes entre lots de pois d'une même variété. Par ailleurs, la mesure des pertes endogènes de protéines montre des différences considérables entre variétés, la variété Solara stimulant peu les pertes comparativement aux variétés Amino, Madria et Eiffel (Hess et al 1998). De plus, à égalité de stimulation des pertes de thréonine, l'acide aminé essentiel le plus abondant dans les protéines endogènes, la digestibilité réelle de Madria est plus élevée que celle de Eiffel (Hess et al 2000) (la même différence est trouvée en termes de digestibilité de l'amidon). Le classement des variétés n'est donc pas le même en termes de digestibilité apparente standardisée et en termes de disponibilité vraie des acides aminés. Là encore, les différences ne s'expliquent pas par les données classiques de composition chimique des graines. Seules des données de structure des macromolécules ou d'organisation cytologique de la graine semblent être en mesure d'expliquer ces résultats.*

Les données décrivant précisément les effets des traitements technologiques et plus spécifiquement ceux de la granulométrie ou des traitements thermiques sont très fragmentaires. Chez le très jeune porc, un traitement thermique améliore significativement l'utilisation digestive et métabolique des protéines de pois, mais, il supprime un effet bénéfique, peut-être lié aux propriétés émulsifiantes des protéines de pois, sur la digestibilité des matières grasses ajoutées au régime (Sève et al 1985). Le toastage n'améliore pas systématiquement la digestibilité des acides aminés (Canibe et Eggum, 1997), le floconnage est inefficace (Marlier et al, 1989). Un effet spectaculaire de l'extrusion n'a été montré que dans le cas d'une variété d'hiver, alors qu'aucun effet n'était observé avec une variété de printemps. Pour cette raison ce résultat a été attribué à la neutralisation complète du facteur antitrypsique (Bengala Freire et al 1991; Mariscal-Landin 1992). Cependant, le traitement mécanique drastique lié à l'extrusion peut avoir d'autres conséquences. En effet, un broyage en particules très fines (micro-broyage à 25  $\mu\text{m}$ ) améliore considérablement la digestibilité réelle des protéines (90 vs. 81%) et des acides aminés (lysine 95 vs. 83%) comme celle de l'amidon (97 vs. 89%) (Hess et al, 2000). *Ces résultats suggèrent que l'accessibilité des substrats aux enzymes est un facteur explicatif majeur de la digestibilité des éléments nutritifs du pois chez le porc.*

Malgré une teneur en parois végétales plus élevée, la digestibilité iléale des protéines, mesurée il est vrai sur un nombre beaucoup plus restreint de variétés et de lots, est plutôt meilleure dans la féverole que dans le pois (Tran et al 1999). La même observation est faite dans le cas du lupin bleu alors que la teneur en constituants pariétaux est encore beaucoup plus élevée. On a récemment attribué ce paradoxe à la faible teneur en protéines du résidu NDF (Neutral Detergent Fiber) de van Soest du lupin (Gdala et al 1998a) Toutefois, dans les graines protéagineuses, la fiabilité des déterminations de résidus de van Soest est sérieusement mise en doute. Il n'est pas surprenant, parce qu'il est globalement mal utilisé,

que la digestibilité de la lysine du lupin blanc soit significativement inférieure à celle du lupin bleu et à celle du pois (Mariscal Landin 1992); mais contrairement à ce que nous avons vu dans le cas de l'énergie nette ce résultat est très loin d'être catastrophique. En effet, la stimulation de la croissance des viscères, qui explique la mauvaise valeur énergétique nette du lupin blanc, n'affecte pas l'efficacité du processus digestif. Des données polonaises disponibles pour 5 variétés de lupin jaune donnent des valeurs de digestibilité élevées, plutôt comparables à celles du lupin bleu (Wasilewko et al 1999). En ce qui concerne les pertes endogènes spécifiques, les féveroles testées sont plutôt comparables aux pois les plus stimulateurs de ces pertes (données de l'AIP ALIMAN); aucune donnée n'est disponible dans le cas du lupin.

#### ▪ Chez les volailles

Les tannins que l'on trouve en quantités importantes dans les graines de pois à fleurs colorées, comparativement aux pois à fleurs blanches, réduisent encore plus la digestibilité des protéines (64.3 vs. 78.8, respectivement) que chez le porc (Grosjean et al 1999). Ce résultat est retrouvé quel que soit le mode de présentation du régime, farine ou granulé, alors que la granulation améliore très significativement la digestibilité des protéines (de 64.4 à 74.3 et de 79.1 à 85.5 respectivement) La granulation ne supprime donc pas l'effet dépressif des tannins. Si l'on restreint le champ aux graines de pois lisses à fleurs blanches, on constate que la variabilité de ce critère est élevée lorsque l'aliment est présenté en farine (CV 4.8 %) et diminue fortement lorsque l'aliment est présenté en granulé (CV 1.4 %). Comme précédemment pour le porc, dans la population évaluée lors du programme PEA, *aucune donnée de composition biochimique, ni les tannins condensés, ni la cellulose brute, ni les facteurs antitrypsiques, n'a permis, à elle seule, de prédire la digestibilité des protéines des graines de pois à fleurs blanches.* Il en est de même de critères plus sophistiqués tels que la teneur en parois cellulaires insolubles (WICW) ou la proportion des diverses classes de protéines dans les matières azotées (légumine, viciline, albumines). *Cela semble indiquer que d'autres facteurs explicatifs comme la structure fine des constituants, leur localisation et/ou l'organisation cytologique de la graine doivent être pris en compte.* Quelques données bibliographiques concernant l'influence des caractéristiques structurales des protéines sur leur digestion sont disponibles. Ainsi les protéines de type 7S du pois, la viciline et la convicine, semblent totalement digérées par le poulet contrairement à la phaséoline, protéine homologue du haricot. Par contre dans la légumine, protéine de type 11S, il faut distinguer les polypeptides basiques qui sont les seuls à être détectés dans l'iléon par opposition aux polypeptides acides non détectés. De même dans le cas des albumines il conviendrait de distinguer la fraction PA2, encore partiellement présente dans l'iléon du poulet, de la fraction PA1 complètement dégradée (Créviu et al 1997a). On sait aussi que les lectines et les inhibiteurs tryptiques traversent le tractus digestif sans être hydrolysés et font partie des protéines exogènes excrétées.

Comme pour la valeur énergétique, la granulométrie résultant du broyage a fait l'objet d'une attention particulière. Les premiers résultats de ces études ne montraient aucun effet de la finesse de broyage sur la digestibilité des protéines (Carré 1997). Plus récemment, en prenant soin d'obtenir deux moutures de pois avec très peu de recouvrement dans la répartition granulométrique il a été possible de montrer qu'une mouture fine (31  $\mu\text{m}$ ) pouvait améliorer de 7 points la digestibilité des protéines comparativement à une mouture grossière (920  $\mu\text{m}$ ) (Créviu et al 1997b). La différence semble bien liée à une hydrolyse enzymatique plus poussée des protéines présentes dans les plus fines particules, et donc, comme chez le porc, à une amélioration de la digestibilité réelle. Selon les auteurs, *ces résultats montrent que*

*L'accessibilité du substrat aux enzymes est bien un facteur limitant la digestibilité des protéines de pois, à un moindre degré toutefois que la digestibilité de l'amidon.* Ils soulignent cependant que l'amélioration obtenue avec un broyage fin, comparativement à un broyage grossier, est limitée par une accumulation relativement plus importante dans l'iléon de peptides qui ne seront pas absorbés.

▪ Chez les ruminants

La forte dégradabilité des protéines dans les graines broyées constitue le principal handicap des matières azotées des graines protéagineuses, dont les valeurs PDI<sup>4</sup> (tables INRA 1988) sont particulièrement faibles. Il est vrai que la méthode de référence, *in sacco*, utilisée pour l'évaluation de la dégradabilité donne des valeurs plus élevées ( $\approx 0.90$ ) que les valeurs mesurées directement *in vivo* ( $\approx 0.80$ ) (Remond et al 1997; Poncet et al 1998a). Les peptides et protéines solubles perdus lors de la mesure *in sacco* n'expliquent que la moitié de la différence. La dégradabilité des protéines de lupin est encore plus forte, la différence *in vitro-in vivo* étant beaucoup plus faible que dans le cas du pois (0.96 vs 0.92). Elle s'explique alors entièrement par la perte des fractions protéiques solubles. Même en tenant compte de ces travaux récents qui conduisent à doubler les valeurs PDIA<sup>5</sup> de ces deux protéagineux par rapport à celles des tables (51 et 23 g/kg respectivement pour le pois et le lupin), **la proportion des protéines échappant à la dégradation ruminale (« by-pass ») est faible.** Les mesures récentes en France (INRA) et à l'étranger ont fait apparaître une sous-estimation générale de l'efficacité de la synthèse microbienne nécessitant une correction des valeurs de PDIME<sup>6</sup>. C'est ainsi que la valeur PDIE (PDIA + PDIME<sup>7</sup>) du tourteau de soja passeraient de 254, valeur tables, à 284 g/kg, valeur corrigée. C'est à cette dernière valeur qu'il faut comparer les résultats des mesures récentes: valeurs PDIE de 143, 127 et 114 g/kg pour le pois, la féverole et le lupin, respectivement (Poncet et al, et Moncoulon, non publié). **Rapportée à la teneur en protéines de la graine, la valeur du pois se rapproche de celle du tourteau de soja, alors que les valeurs du lupin et de la féverole sont nettement plus faibles.** Au plan économique, il faut cependant comparer, d'une part, aux tourteaux métropolitains dont les valeurs PDIE corrigées sont plus élevées (150 et 180 g/kg, respectivement pour le tourteau de tournesol 35-42 et le tourteau de colza), et d'autre part, aux céréales (blé et surtout maïs) dont les valeurs PDIA sont similaires, et dont les valeurs PDIE corrigées ne devraient guère être plus faibles.

Contrairement aux tourteaux, les graines de légumineuses sont utilisées crues après un simple broyage, sans aucun traitement thermique. Or, on sait que les traitements thermiques provoquent une insolubilisation des protéines (Perrot, 1995) susceptible de réduire la dégradabilité des protéines dans le rumen. Pour l'instant les études technologiques concernant les protéagineux se sont limitées à des traitements relativement drastiques (185 °C) et coûteux de cuisson-extrusion. Dans le cas du pois, la valeur PDIA passe de 51 à 136 g/kg et la valeur PDIE de 143 à 237 g/kg, approchant en valeur absolue celle du tourteau de soja (284 g/kg) (Poncet et al, non publié). Dans le cas de la féverole, la valeur PDIA passe de 33 à 58 g/kg et la valeur PDIE de 127 à 178 g/kg (Moncoulon, non publié). Dans le cas du lupin, la valeur PDIA passe de 23 à 92 g/kg et la valeur PDIE de 114 à 175 g/kg (Poncet et al, 1999). **On retrouve donc, même après traitement thermique, l'avantage du pois par rapport aux autres protéagineux.**

<sup>4</sup> PDI protéines digérées dans l'intestin

<sup>5</sup> PDIA, PDI d'origine alimentaire

<sup>6</sup> , PDIE, PDI d'origine microbienne + alimentaire

<sup>7</sup> , PDIME, PDI d'origine strictement microbienne

- *Valeur sanitaire*

On s'est surtout intéressé aux conséquences nutritionnelles de la présence de facteur antinutritionnels, et *les études concernant la valeur sanitaire proprement dite sont rares*. Les fermentations anormales (flatulence) provoquées par les sucres solubles non digestibles (alpha-galactosides) ont conduit, nous l'avons vu, à des accidents. La distribution de farine crue de soja riche en facteurs antinutritionnels thermosensibles a pour premier effet de réduire l'appétit des animaux, prévenant ainsi des diarrhées éventuelles de sevrage chez les porcelets. Les facteurs antitrypsiques produisent généralement, chez les volailles surtout, une hypertrophie fonctionnelle du pancréas. Les effets physiopathologiques des lectines, également thermosensibles, sont bien connus chez les mammifères. Celles du haricot provoquent des troubles digestifs liés à leur propriété de se fixer sur la muqueuse intestinale entraînant non seulement une malabsorption mais également une hypertrophie allant parfois jusqu'à une véritable cancérisation de la muqueuse digestive (Bertrand, 1984) et même du pancréas (Grant et al 1989). La toxicité est maximale dans le cas du haricot, intermédiaire dans le cas du soja et semble minimale dans le cas du pois (Bertrand et al 1988). Notons toutefois que les facteurs antitrypsiques et les lectines du pois semblent interagir négativement dans le processus de digestion (Le Guen et al 1995)

Les problèmes posés par la féverole, concernant les troubles de la ponte et l'effet dépressif sur le poids de l'œuf (Lacassagne 1988), ont été résolus par le développement de variétés exemptes de vicine et convicine (Duc et al 1999).

Chez le porc, sur la base d'une série de critères électrophysiologiques susceptible de caractériser l'ulcérogénicité gastrique des matières premières alimentaires, le pois se classe plutôt bien par rapport aux autres matières premières, mieux que le blé quoique moins bien que le son de blé (CH Malbert et S Guérin, INRA-UMRVP, non publié).

- ◆ *Recherches en cours*

➤ En France, l'action Génoplante Pea C (INRA- semenciers) vise à la maîtrise génétique mais aussi à une meilleure compréhension de la valeur nutritionnelle du pois. Au département ENA de l'INRA (UMRVP, URH, SRA) les recherches sur les protéagineux concernent principalement l'impact de la technologie (broyage, traitements thermiques divers). D'autre part, un effort important concerne la distinction entre les fractions protéiques indigestibles endogènes et exogènes chez le porc (AIP ALIMAN, projet européen FAIR AMINOPIG) et, à un moindre degré, chez les volailles... Chez les volailles l'accent est en effet surtout mis sur l'utilisation de l'amidon. L'utilisation de lupin bleu, entier et décortiqué, en comparaison avec le lupin blanc, fait chez le porc l'objet d'une collaboration entre l'INRA et une équipe australienne (Université d'Adelaïde)

Chez les ruminants, les principaux travaux concernent les moyens de limiter la dégradabilité des protéines. Après avoir produit un grand nombre de données sur l'analyse de la variabilité de la valeur nutritionnelle chez les monogastriques (porcs et volailles), en liaison étroite avec l'UNIP (programme européen ECLAIR PEA), l'ITCF semble plutôt en recul sur ces recherches.

Les programmes des 4 prochaines années à l'INRA seront dominés par des actions en relation avec la santé et le bien-être des animaux (valeur sanitaire).

➤ Au niveau européen, l'Association Européenne des Protéagineux (AEP) coordonne une action concertée d'échanges entre les équipes européennes impliquées dans les recherches sur les protéagineux en génétique, agronomie, alimentation animale et humaine (Legume Interactive Network). Cette action permet de constater les préoccupations de l'Europe du Nord

("sticky manure", fèces abondantes et collantes , voir ci-dessous). Les recherches sur les PNA (Danemark, Pologne, Hollande) y sont plus actives qu'en France. Mais on s'intéresse aussi, principalement en Pologne, en Hollande et en Belgique à la digestion des protéines. Toutefois, les études sur l'influence sur la valeur protéique de la composition de la graine en différentes classes de protéines sont absentes ; cela semble constituer une approche originale des équipes françaises..

➤ Au Canada on s'intéresse également à la digestion des protéines. Les études australiennes sont très focalisées sur l'utilisation du lupin par le porc. En Pologne, cette dernière espèce fait également l'objet d'une attention particulière aussi bien sur les lupins bleu et jaune que sur le lupin blanc.

## ◆ **Commentaires et perspectives**

### **Aspects nutritionnels**

#### ➤ **Composition des matières premières**

La grande majorité des travaux effectués en alimentation animale porte sur le pois qui est aussi, de loin, le protéagineux le plus cultivé. Les féveroles 0 tannins et 0-vicine + convicine restent objectivement moins intéressantes pour le monogastrique, du fait de teneurs légèrement plus élevées en PNA, quoique, chez le porc, la digestibilité iléale de leurs protéines soit au moins aussi bonne que celle du pois. Chez le ruminant du fait d'une dégradabilité encore plus élevée de leurs protéines, les perspectives d'amélioration de l'utilisation par la technologie sont moins prometteuses pour les féveroles que pour le pois. On retrouve les mêmes inconvénients, en pire, dans le cas du lupin.

***Chez les volailles, la valeur énergétique est le premier facteur limitant de l'utilisation des protéagineux (concurrence avec les céréales). Chez le porc, le facteur le plus limitant serait la digestibilité iléale des protéines (concurrence avec le tourteau de soja).*** Dans chaque cas (énergie et protéines), pour ces deux espèces animales, des marges de progression existent, mais il est clair que les études devraient associer étroitement les zootechniciens et leurs collègues biochimistes et technologues, d'une part, aux agronomes et aux généticiens des plantes, d'autre part.

Pour les porcs comme pour les volailles, l'application d'un broyage à la limite de ce qu'il est techniquement (mais non économiquement) possible de réaliser permettent d'incriminer *l'accessibilité du substrat aux enzymes*. Celle-ci est limitée par les parois cellulaires, principalement au niveau cotylédonaire. Les recherches en cours ne permettent cependant pas de mettre directement en relation les valeurs énergétiques ou protéiques, avec les simples taux de ces parois, même lorsque celles-ci incluent les pectines insolubles (WICW ou analogue). Toutefois des caractéristiques physiques telles que *l'épaisseur des parois, la taille et la forme des cellules* pourraient affecter directement l'accessibilité des substrats aux enzymes ou indirectement en déterminant une certaine *"aptitude de la graine au broyage"* (données de J.P. Melcion et B. Carré, INRA-Nantes et Tours). La plus forte ***digestibilité réelle des protéines*** du pois Eiffel et la plus faible digestibilité de l'amidon du pois Amino comparées à celles du pois Solara (données de V. Hess et B. Sève) pourraient s'expliquer de cette manière. ***Si ce concept était établi, il faudrait sans doute rechercher des variétés à cellules cotylédonaire plus grosses à parois moins épaisses et de forme moins sphérique*** (données de C. Mousset et G. Duc INRA-Dijon). Toutefois, les facteurs agronomiques doivent également être considérés au même titre que les facteurs génétiques car ils conditionnent fortement les mécanismes physiologiques impliqués dans le développement et l'élaboration de la graine.

On a observé que des conditions climatiques particulièrement difficiles (froid puis sécheresse), se traduisent par des teneurs en protéines anormalement faibles; on ne sait pas ce qu'il en est du profil protéique (albumines/globulines...).

Une digestibilité réelle supérieure peut aussi s'accompagner de *pertes de protéines endogènes* importantes. Dans ces conditions, la digestibilité standardisée (critère actuellement utilisé), qui tient compte de la somme des pertes alimentaires et endogènes attribuables à l'aliment, ne sera pas meilleure et, la disponibilité des acides aminés, déterminée par l'apport exogène et le coût métabolique des pertes endogènes, sera plus faible. De telles différences de pertes endogènes sont observées si l'on compare divers lots de pois (Eiffel vs Solara) **Comment expliquer les variations très importantes de pertes endogènes enregistrées entre variétés ?** Certaines observations suggèrent qu'il peut y avoir stimulation des sécrétions (Freire et al 1997), d'autres une limitation de la réabsorption (Grala et al 1998). Certains auteurs mettent en cause la nature des fibres, particulièrement leur richesse en pectines insolubles à forte capacité de rétention d'eau, qu'il conviendrait sans doute de quantifier plus précisément et d'analyser sur le plan structural. Toutefois, il semble que la capacité de rétention d'eau des parois soit fortement réduite et que son effet sur les pertes endogènes disparaisse après microbroyage (Leterme et al, 1996). Cette dernière observation suggère à nouveau que la structure des parois, voire des cellules, serait aussi importante que leur composition. On pense aussi à la nature des protéines (albumines vs. globulines...) qui par leurs propriétés physicochimiques et fonctionnelles, voire immunogènes, pourraient influencer les sécrétions protéiques et leur recyclage. *La connaissance de ces protéines doit être approfondie si l'on veut maîtriser l'influence des facteurs génétiques et agronomiques sur la qualité nutritionnelle de la graine.*

***Chez le ruminant, la concurrence des céréales, au plan énergétique, et du tourteau de soja, au plan azoté, est probablement encore plus vive que chez le monogastrique*** en ce qui concerne les graines protéagineuses crues. En effet, le système énergétique continue de favoriser les aliments riches en protéines en termes d'efficacité pour la croissance. De plus, la valeur azotée même revisitée (travaux de Poncet et al), notamment en termes de PDIA, est très inférieure à celle du tourteau de soja et pas suffisamment différente de celle des céréales. ***Il est peu probable de découvrir des variétés à fleurs blanches peu dégradables*** et, apparemment, on n'envisage pas d'utiliser chez le ruminant les variétés à fleurs colorées naturellement riches en tannins. On soupçonne qu'en relation avec les conditions de culture, certains lots des variétés à fleurs blanches actuellement cultivées peuvent présenter une dégradabilité plus faible et être plus adaptés aux ruminants qu'aux monogastriques. Si des tests rapides étaient développés ceci pourrait intéresser les professionnels de l'alimentation animale.

➤ ***Quelles améliorations peut-on attendre de la technologie ?***

D'abord, comme pour les autres sources alimentaires, ***l'impact du broyage*** mérite d'être approfondi en termes d'optimisation aussi bien de la taille des particules que de la quantité d'énergie absorbée.

L'efficacité du pressage (***granulation***) est bien montrée chez les volailles et on suppose que son effet s'ajoute à celui du broyage ; il faudrait modéliser la dégradabilité des constituants, protéines et amidon, en fonction de l'énergie totale absorbée au cours des process. Chez le porc, l'impact sur les valeurs azotées (digestibilité iléale) n'a pas été chiffré. S'agissant d'un traitement très largement appliqué en alimentation animale, il semble naturel d'évaluer les protéagineux, comme les autres matières premières, après granulation des aliments, chez le porc comme chez les volailles.

La granulation constitue déjà un traitement thermique modéré. L'application aux graines protéagineuses *de traitements thermiques spéciaux*, plus drastiques, plus sophistiqués et plus coûteux (floconnage, toastage, extrusion) ne se justifie guère au vu des résultats obtenus, sauf peut-être pour les animaux plus jeunes (porcelet, poussin). Toutefois, si des traitements de thermisation doivent être utilisés pour des raisons sanitaires (traitement anti-salmonelles par exemple), il est évident que leur impact nutritionnel doit être optimisé.

Chez le ruminant, le seul espoir d'utiliser les variétés couramment disponibles (pois lisses à fleurs blanches) est de leur faire subir un traitement thermique susceptible de réduire la dégradabilité des protéines. Selon C. Poncet, il conviendrait d'étudier des solutions moins coûteuses que la cuisson-extrusion (toastage, roasting...). Des traitements thermiques plus simples peuvent être optimisés pour éviter le blocage de la lysine ou de l'arginine. L'utilisation d'additifs, métabisulfite par exemple, peut être envisagée pour économiser de l'énergie en réduisant la température permettant de produire l'effet recherché. On pense à l'utilisation de lignosulfite ou "eaux blanches" issues de l'industrie du bois renfermant du xylose et des tannins. Pour limiter la dégradabilité, on peut aussi proposer d'ajouter à la ration des tannins de châtaigner à la dose de 10 à 15 % des matières azotées. Dans tous les cas, il conviendra de vérifier que ces traitements visant à augmenter les teneurs en PDIA n'affectent pas la digestibilité intestinale des acides aminés.

Contrairement à ce qui a été publié dans le cas des céréales, *l'addition de préparations enzymatiques* susceptibles d'attaquer les parois végétales (hémicellulase, cellulase, pectinase, bêta-glucanase, endoglucanase, alpha-galactosidase, protéases etc.) se révèle inefficace pour améliorer l'utilisation du pois chez le poulet. Ceci s'explique pour une part par le fait que la viscosité des digesta de pois est peu importante, et pour une autre part par un temps d'action insuffisant du fait de la rapidité du transit (Carré, communication personnelle). D'une manière générale, quelle que soit la matière première, les enzymes sont plutôt inefficaces chez le porc. En revanche, l'utilisation d'alpha-galactosidase améliorerait chez le lupin, la digestibilité des alpha-galactosides sans stimuler l'utilisation des PNA, mais en favorisant l'utilisation digestive des acides aminés (Gdala et al 1997). Malgré tout, en définitive, *l'addition d'enzymes à la ration semble peu efficace pour améliorer la valeur nutritionnelle des graines protéagineuses quels que soient l'espèce et le type d'animal considérés.*

#### ► *La supplémentation en acides aminés*

Les effets des *déficits en acides aminés* totaux des graines protéagineuses sont généralement accentués lorsqu'on considère les acides aminés digestibles ou disponibles chez les monogastriques. En effet, la digestibilité de la cystine, l'un des acides aminés soufrés et celle du tryptophane sont particulièrement faibles. De plus, leur disponibilité est probablement surestimée par la simple mesure de digestibilité du fait de leur abondance dans les pertes endogènes, ainsi que cela a pu être montré pour la thréonine, l'acide aminé limitant suivant. La faible disponibilité des acides aminés soufrés peut s'expliquer par la très faible digestibilité de plusieurs protéines de faible masse moléculaire riches en cystéine (inhibiteurs de protéases, PA1..). Des approches génétiques sont peut-être envisageables pour rendre ces acides aminés plus disponibles pour l'animal. Ces déficits sont actuellement compensés par supplémentation avec des acides aminés industriels relativement bon marché (DL-méthionine et de L-thréonine). Dans le troisième cas, le développement très récent de la production industrielle de L-tryptophane devrait également résoudre le problème.

Il faut évoquer le positionnement du pois comme matière première pour l'alimentation animale dans l'hypothèse où les nouvelles variétés de soja apparaissant sur le marché auraient une composition en acides aminés mieux équilibrée que les variétés actuelles. Cette situation est probable car des stratégies sont engagées aux USA qui consistent à modifier la séquence des protéines de réserve (moyen terme) ou à faire exprimer des acides aminés essentiels sous

forme d'acides aminés libres dans la graine (court terme). Dans une telle conjoncture de concurrence, le pois pourrait disparaître de l'alimentation des monogastriques. Par conséquent, même si les acides aminés de synthèse constituent aujourd'hui la voie privilégiée de supplémentation, il ne faut pas écarter les approches génétiques qui permettraient de rééquilibrer le pois en acides aminés limitants.

### **Aspects sanitaires**

Les progrès génétiques, en prenant en compte l'incidence de composés particuliers (facteurs antitrypsique, tannins, vicine-convicine, etc.) ont permis d'incontestables améliorations aussi bien au plan de la valeur nutritionnelle que de la valeur sanitaire des graines protéagineuses. Certains problèmes tels que celui posé par le lupin blanc restent encore à éclaircir, peut-être en considérant des effets bi- ou multifactoriels (alcaloïdes particuliers, oligo-saccharides, lectines?). *Toutefois, indépendamment de ces facteurs antinutritionnels, la variabilité des propriétés nutritionnelles entre lots ou, pour un même lot, entre élevages, même si elle peut être réduite par la simple granulation chez le poulet, suggère fortement une incidence de l'utilisation des protéagineux dans le statut sanitaire de l'animal.*

En Europe du Nord (pays scandinaves, Angleterre et même Allemagne), le pois lorsqu'il est incorporé à plus de 15 % dans la ration du porc, présente la fâcheuse réputation de provoquer l'émission de fèces abondantes et collantes ("*sticky manure*"), préjudiciable à la propreté des animaux et, dans une moindre mesure, à leurs performances. Un tel état peut s'expliquer par une hypersécrétion de mucus mesurable par les pertes endogènes spécifiques dont on connaît maintenant mieux l'importance. Plus que les facteurs dits antinutritionnels, ces observations mettent probablement en cause les propriétés fonctionnelles des PNA (propriétés gélifiantes, épaississantes...), leurs interactions avec les protéines, ainsi que la composition de la flore intestinale. Dans cet ordre d'idées, il faut certainement examiner aussi la possibilité d'une interaction entre pois et orge, les régimes à base d'orge étant beaucoup plus utilisés en Europe du Nord qu'en France. On ne peut exclure non plus l'hypothèse d'une incidence de l'allergénicité ou de l'immunogénicité des protéines bien que de tels inconvénients concernent davantage le veau préruminant que le porc. Enfin, notons que l'incidence de la technologie (broyage, granulation, thermisation) est sans doute aussi importante dans ces différents domaines qu'en matière nutritionnelle.

Si l'efficacité nutritionnelle pure s'améliore avec la finesse du broyage, on sait qu'un broyage trop fin peut entraîner certains inconvénients. Il semble que le pois soit peu concerné dans l'étiologie des ulcères gastriques chez le porc. Chez le poulet, en accélérant la dégradation de l'amidon ou de certaines protéines, un broyage trop fin pourrait présenter l'inconvénient de créer un choc osmotique susceptible d'accélérer le transit digestif, ce qui pourrait provoquer des diarrhées. Ce phénomène serait de toute façon préjudiciable à la phase terminale de la digestion des protéines moins facilement accessibles ou digestibles et provoquerait l'accumulation constatée des peptides au niveau iléal et cæcal (Crévieu et al 1997b). Chez le ruminant, un broyage trop fin peut conduire à une dégradation trop rapide de l'amidon et provoquer une acidose. *Ainsi, la définition d'un broyage optimum doit être faite et la recherche de variétés "aptées au broyage" doit être engagée.*

Contrairement à ce qui est avancé chez l'Homme, notamment leur effet hypocholestérolémiant, les effets des PNA des graines de légumineuses sont plutôt considérés comme négatifs en alimentation animale (Gdala et al 1998). Toutefois, il n'est pas exclu que des études sur les fermentations de l'amidon résistant ou des PNA (par exemple les galactomannanes) permettent de mettre en évidence des effets prébiotiques favorables à une stabilisation de la flore digestive des animaux.

## ◆ **Conclusions**

En définitive, à quelques exceptions près, lorsque l'on cherche à promouvoir l'utilisation des graines protéagineuses en remplacement du tourteau de soja, les technologies alimentaires sophistiquées et l'utilisation d'additifs à la ration sont soit inefficaces soit trop coûteuses. En cette matière, les espoirs doivent plus se fonder sur la création de nouvelles variétés et l'amélioration des variétés existantes ou de leurs conditions de cultures. Il est nécessaire cependant de prendre en compte dans ces recherches l'aptitude de la graine à la transformation par des procédés simples (broyage, granulation).

Des recherches plus approfondies sur la nutrition ou sur les interactions nutrition-santé devraient permettre de mieux documenter l'influence de la composition fine de la graine mais aussi celle de la localisation des nutriments et de l'organisation cytologique (taille des cellules, épaisseur des parois...) pour apporter de nouveaux objectifs d'amélioration de la qualité des graines aux généticiens et aux agronomes. *Ainsi, si l'objectif d'augmenter la teneur en protéines des pois peut être considéré comme pertinent pour toutes les catégories d'animaux, cela ne doit pas être réalisé sans prendre un certain nombre de précautions.* Chez les volailles, cela concerne le maintien d'une valeur énergétique acceptable, en contrôlant le taux de PNA et les facteurs favorisant la digestibilité de l'amidon. Chez le porc, particulièrement dans le cas du pois, il faut plutôt mettre l'accent sur les facteurs favorisant la digestibilité des protéines et notamment la limitation des pertes endogènes. Pour ces deux espèces, il convient de s'intéresser à la structure des parois cellulaires et des protéines. Il semble que les études relatives aux profils des protéines et à leur impact présentent un caractère d'originalité. Chez le ruminant, il convient de vérifier que la dégradabilité ruminale des protéines n'est pas accentuée. Une autre précaution indispensable serait, dans tous les cas, de ne pas accentuer les déficits en acides aminés, et plus particulièrement en tryptophane, pour des raisons économiques.

## ◆ **Adresse des laboratoires connus .**

### Allemagne

FBN Ernährungsphysiologie 'Oskar Kellner', Rostock

### Australie

Victorian Institute of Animal Science, Werribee

SARDI-Pig and Poultry Production Institute, Adelaide

### Belgique

UER de Zootechnie, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques (FUSA) de Gembloux

Département de Production Animale Faculté d'Agriculture et de Sciences Biologiques

Appliquées, Université de Gand

### Canada

Department of Animal Science, University of Manitoba, Winnipeg

Department of Animal Science, University of Alberta, Edmonton

### Danemark

Danish Institute of Agricultural Science, Department of Animal Nutrition and Physiology, Research Centre Foulum.

### France

INRA SRA, Centre de Recherches de Tours, Nouzilly

INRA UMRVP, Centre de Recherches de Rennes, Saint-Gilles

INRA URH, Centre de Recherche de Clermont-Ferrand, Theix  
 INRA-INAPG, Paris  
 ITCF, Institut Technique des Céréales et Fourrages, Paris

Hollande

ID-Lelystad, fusion de ex ID-DLO et TNO Nutrition and Food Research Institute de Wageningen, Lelystad

Wageningen Agricultural University, Department of Animal Nutrition, Wageningen

Pologne

Kielanowski Institute for Animal Physiology and Nutrition, Jablonna

Olsztyn University of Agriculture and Technology, Olsztyn

Department of Animal Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Agricultural University of Lublin

◆ **Références bibliographiques (liste restreinte)**

- Bastianelli D et al, 1998. *Animal Science*, 67-609-619.  
 Bengala Freire JP et al, 1997. EAAP Publication n° 88, 554-557.  
 Carré B, 1997. Deuxièmes Journées de la Recherche Avicole, tome 1. INRA-ITAVI\*.  
 Créviu-Gabriel I, 1999. *INRA Prod. Anim.* 12, 147-161  
 Duc et al 1999 *J. Agr. Sci.*, 133, 185-196  
 Gdala J et al, 1998. *J. Anim. Feed Sci.*, 7, 131-150.  
 Grala W. et al, 1998. *J. Anim. Feed Sci.*, 7, 1-20.  
 Grosjean F et al, 1999. *Animal Science*, 69, 591-599.  
 Hess V et al 2000. Journées de la Recherche Porcine en France, 32, 207-215.  
 King RH et al, 2000. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 83, 17-30.  
 Lacassagne L, 1988. *INRA Prod. Anim.*, 1, 47-57.  
 Leterme et al, 1996 Journées de la Recherche Porcine en France, 28, 407-412  
 Maaroufi C et al, 2000. *Anim. Feed Sci. Technol.* 85, 61-78.  
 Mariscal-Landin 1992. Facteurs de variation de l'utilisation digestive des acides aminés chez le porc. Thèse, Université Rennes I, 134 p.  
 Noblet J et al, 1998. Journées de la Recherche Porcine en France, 30 239-243.  
 Perez JM et Bourdon D, 1992. 1<sup>ère</sup> Conférence Européenne sur les Protéagineux, Angers.  
 Perrot C, 1995. *INRA Prod. Anim.*, 8, 151-164.  
 Poncet C et al 1998. Proc. 3<sup>rd</sup> European Conference on Grain Legumes. Valladolid, Spain, 14-19/11/98, 16-17.  
 Remond D et al 1997. *Renc. Rech. Ruminants* 4, 133-136  
 Sève B. et al 2000. Proc. 8th Symp. Digest. Physiol. Uppsala (Sweden), sous presse  
 Tran et al 1999 Ajustement des apports d'acides aminés aux besoins des porcs par la prédiction et la tabulation de leur disponibilité digestive dans les matières premières. Programme Agriculture Demain. Rapport final. Base de données pour CDROM Amipig, © 2000 AFZ, Ajinomoto, Eurolysine, Aventis Animal Nutrition, INRA et ITCF.  
 Van Nevel C et al, 2000. *Anim. Feed Sci. Technol.* 83, 89-101

## 4.4 Propriétés fonctionnelles et Utilisation : Alimentation Humaine et Applications Non-Alimentaires

### Introduction

*Le marché des protéagineux en alimentation humaine est divers et concerne aussi bien l'utilisation de la graine entière mature que celle des farines ou des fractions dérivées.* La consommation des graines matures relève du marché des légumes secs et principalement de celui du haricot, de la lentille, ou du pois chiche. La consommation de la graine de pois mature est limitée à certains pays (Europe de l'est, Inde). Si des travaux sont menés sur la qualité culinaire des haricots ("hard to cook"), rien n'est fait de similaire dans le cas du pois.

*Parallèlement, des marchés niches se sont développés pour les farines et les produits dérivés utilisés comme ingrédients alimentaires.* La farine de fève est utilisée pour son activité lipoxygénasique en additif dans la farine de blé; les concentrés protéiques de fève ou de pois, texturés ou non, sont surtout employés comme ingrédients nutritionnels en alimentation humaine ou animale (animaux domestiques). Les isolés protéiques de pois, les fractions enrichies en amidon ou fibres sont utilisées comme ingrédients fonctionnels en alimentation humaine (produits carnés, pâtisserie, viennoiserie, ...). Ces produits issus du pois ont réussi à s'implanter en Europe sur ce marché très concurrentiel dominé par le soja.

Les travaux de recherche ont été consacrés principalement aux procédés de fractionnement dans les années 1975-1990 et ont permis le développement de procédés industriels de séparation par voie sèche (procédé concentré : broyage + turboséparation) et par extraction sélective en milieu aqueux (procédé isolé : extraction des protéines + précipitation/ultrafiltration). Au cours des dix dernières années les efforts ont été surtout consacrés à l'étude des propriétés fonctionnelles des protéines.

### ◆ Enjeux

La situation du pois sur le marché des matières premières est fragile car son utilisation dépend exclusivement du secteur de l'alimentation animale, industrie à faible valeur ajoutée et dont les approvisionnements fluctuent en fonction du prix du soja et des céréales. Pour développer la culture du pois et consolider la position de cette production sur le marché international il paraît donc important d'en *diversifier les utilisations ; le développement d'une filière industrielle de transformation de la graine, et la promotion d'un marché à l'exportation comme légume sec semblent des voies potentielles à explorer.* En Europe la consommation de légumes secs est faible (3,5 kg/hab/an par rapport à 6-7 kg en moyenne dans le monde) mais certains pays sont gros consommateurs de pois secs (14 kg en Inde) ; d'autre part plusieurs pays européens dont l'Espagne, la Grande-Bretagne et la France semblent avoir la volonté de promouvoir la consommation de légumes secs à cause de leurs teneurs en fibres et en amidon « résistant ». Il est reconnu que la consommation en fibres alimentaires est notoirement insuffisante dans la plupart des pays occidentaux.

### UTILISATION DE LA GRAINE ENTIERE EN ALIMENTATION HUMAINE COMME LEGUME SEC

### ◆ Résultats acquis par la recherche

*Le principal frein à la consommation de légumes secs, y compris le pois ou la fève, est la présence dans ces graines de glucides solubles responsables de flatulence* (principalement les  $\alpha$ -galactosides mais aussi des fibres solubles). La caractérisation de la fraction glucidique

non digestible (fibres alimentaires solubles et insolubles,  $\alpha$ -galactosides) de plusieurs variétés de haricot a été réalisée dans le but de mieux comprendre l'origine des flatulences (FDNH INRA Nantes). Des études sont engagées sur cette graine pour tenter de réduire ces facteurs de flatulence par fermentation ou traitements enzymatiques principalement dans les pays d'Amérique centrale, d'Amérique du sud et d'Afrique. Des approches génétiques seraient peut-être plus efficaces ; on sait cependant que les  $\alpha$ -galactosides ont un rôle physiologique dans la graine et qu'il est sans doute illusoire de les supprimer totalement.

Les légumes secs sont d'autre part des sources de protéines et surtout de glucides lents intéressants chez les sujets diabétiques (diabète II) mais également pour l'ensemble des populations occidentales chez lesquelles les problèmes d'insulinorésistance ne cessent de croître. L'insulinorésistance paraît de plus en plus clairement liée à de nombreuses affections tels que les maladies cardiovasculaires et le cancer du côlon.

En raison même de sa composition, la "résistance" de l'amidon des légumes secs peut être modulée par des traitements technologiques simples. D'autre part les amidons résistants intéressent beaucoup tous ceux qui se préoccupent de prévention et de traitements de maladies du côlon tels que cancer et maladies inflammatoires, car ils produisent en fermentant dans le côlon des quantités importantes de butyrate, le principal nutriment du colonocyte.

#### ◆ **Recherches en cours en France et dans le monde**

Sur le sujet, peu d'études sont effectuées en Europe, à l'exception d'une équipe espagnole (Madrid) et du John Innes Centre (UK) pour les aspects génétiques. L'INRA par ses compétences en biochimie, nutrition et génétique pourrait s'y impliquer utilement.

En ce qui concerne la nutrition humaine, trois unités (URPOI, LPCM, UFDNH - INRA Nantes) se sont déjà beaucoup impliquées sur plusieurs aspects concernant les glucides des légumes secs et la santé. Il s'agit notamment des glucides lents, de l'amidon résistant, des fibres alimentaires (effet sur le transit digestif et les flatulences) et des  $\alpha$ -galactosides (rôle dans les flatulences). L'UFDNH envisage en outre de déposer (en Mars 2001) un projet européen pour approfondir un ou plusieurs de ces aspects.

D'autre part cette unité est impliquée dans des études réalisées en collaboration avec le Venezuela qui ont permis d'acquérir des informations sur la variabilité de la composition inter-variétale du haricot en fibres alimentaires mais aussi en  $\alpha$ -galactosides et tannins.

## **VALORISATION INDUSTRIELLE DES CONSTITUANTS BIOCHIMIQUES DE LA GRAINE**

### ◆ **Résultats acquis par la recherche**

- Procédés de fractionnement et de transformation

#### Séparation des constituants de la graine

Les méthodes de séparation des constituants des graines de légumineuses ont été largement étudiées dans les années 80 et ont abouti à l'élaboration de procédés de fractionnement par voie sèche (broyage + turboséparation) ou par voie humide (extraction aqueuse) qui permettent d'obtenir des fractions plus ou moins enrichies en amidon, fibres et protéines. Dans ce domaine, l'INRA de Nantes a été dans les années 1980-1990 un pionnier en Europe. La turboséparation est utilisée industriellement sur le pois et la féverole et permet de produire des concentrés à 50-55 % de protéines. Par extraction aqueuse (pois, soja) on obtient un isolat (85-90 % de protéines), deux fractions enrichies en amidon (95 %) et en fibres.

Ces technologies sont bien maîtrisées et industrialisées mais ne permettent pas de séparer les principales classes de protéines de la graine.

Dans le cas du soja, des procédés traditionnels de transformation permettent de co-extraire sous forme de « lait » (tonyu) la fraction protéique et lipidique de la graine. Par précipitation du complexe lipoprotéique conduit à l'obtention d'un caillé, le tofu. Traditionnellement consommés en Asie, ces produits se développent aujourd'hui en Europe et Amérique du Nord, induisant le développement de nouveaux programmes de recherches, en

particulier aux USA (Univ. Texas, Univ Iowa). Ces travaux concernent l'étude des mécanismes d'agrégation des protéines de soja et la formation du caillé.

#### Procédés fermentaires et d'hydrolyse

Les procédés fermentaires s'appliquent essentiellement à la graine de soja et aux produits dérivés (tonyu, tofu) et permettent la production de sauces, des produits pâteux ou plus récemment de produits de type yaourt. La flore mise en œuvre se caractérise principalement par les genres *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Actinomyces*, *Mucor*. Les préparations de type yaourt ont été développées en utilisant *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*. (Davin et Bérot 1996).

Ces technologies traditionnelles en Asie font leur apparition en Europe et en France en particulier. Les recherches effectuées presque exclusivement au Japon et en Chine jusqu'à présent se développent depuis peu aux Etats-Unis (Univ. Texas, Univ Iowa). L'INRA est totalement absent de ce secteur.

#### Procédés de texturation

Les procédés de texturation appliqués aux graines de légumineuses sont principalement les procédés de cuisson extrusion. Les recherches ont concerné dans le cas du pois et de la féverole l'extrusion de farines, de concentrés protéiques et de fractions amylacées et dans le cas du soja de farines et de concentrés protéiques. Les travaux ont été menés dans les années 80-90 et les procédés sont aujourd'hui maîtrisés au niveau industriel. Les produits texturés dérivés du pois et de la féverole sont destinés à l'alimentation animale (animaux domestiques) et ceux préparés à partir du soja principalement à l'alimentation humaine (produits carnés).

Le savoir-faire acquis en texturation pour les applications alimentaires a été exploité au cours des dernières années dans le domaine non-alimentaire pour la préparation de matériaux thermoplastiques (AIR 23932, Thermoplastic starches for industrial non-food uses). L'objectif de ces recherches est de relier la structure de l'amidon (rapport amylose/amylopectine, cristallinité) et ses propriétés thermoplastiques. Sur le plan de l'application, des objets 3D peuvent être produits à partir d'amidon et de produits amylacés issus du pois ou de la féverole (Contrat Ademe 9601043) par extrusion et injection-moulage.

#### • *Propriétés fonctionnelles des constituants biochimiques fractionnés dans les applications alimentaires et non-alimentaires*

##### Protéines

✓ Les études ont été principalement consacrées aux protéines. La bibliographie est nombreuse sur le soja (Japon, USA) et permet de disposer d'informations précises sur les propriétés gélifiantes, émulsifiantes, moussantes des principales familles protéiques du soja. Ces études ont permis d'étudier plus en détail les mécanismes de gélification des globulines de soja (11S,7S) et d'établir quelques données sur les relations entre la composition en sous-unités de ces protéines et leurs propriétés. *Ces travaux inspirent aujourd'hui des approches génétiques qui visent à mieux maîtriser la composition de la graine pour y faire exprimer des protéines fonctionnelles (régulation de l'expression, maturation des protéines 11S, stratégie anti-sens, mutagenèse)*. Les travaux sur les propriétés émulsifiantes et moussantes de ces protéines sont plus restreints.

Dans le cas du pois, on dispose d'un inventaire partiel des propriétés fonctionnelles des légumineuses et vicilines, plutôt orienté vers les propriétés émulsifiantes et moussantes. On dispose d'informations sur les mécanismes d'adsorption de ces protéines aux interfaces et l'influence des modifications de la structure oligomérique de ces protéines sur leurs propriétés (UBTP Inra Nantes). Par contre les connaissances sur les relations structure primaire/fonction (propriétés des isoformes, rôle des sous-unités) sont encore très limitées. Il est très probable comme cela a été démontré dans le cas du soja, que certaines isoformes possèdent des propriétés fonctionnelles supérieures à d'autres. De même on connaît très peu les potentialités fonctionnelles de la fraction "albumine". Cela constitue un frein au développement de travaux de génétique ayant pour objectif l'amélioration de la qualité fonctionnelle de ces protéines.

✓ *Concernant les utilisations non-alimentaires de ces protéines*, le principal effort de recherches a été consacré ces dernières années à l'étude des propriétés filmogènes et thermoplastiques dans le but de développer des matériaux renouvelables et biodégradables. D'autres domaines ont également fait l'objet de travaux, mais plus restreints, comme les utilisations de ces protéines comme adhésif dans les colles. Beaucoup de ces travaux ont été effectués par des groupes industriels et ont donné lieu à des brevets (Nieddu *et al.*, 1999). Ces

travaux démontrent l'intérêt de ces protéines comme biopolymères pour la préparation de films. Leurs limites à l'utilisation résultent principalement des modifications des propriétés des matériaux en fonction de l'humidité relative. Dans le cadre d'une collaboration entre l'UBTP (INRA Nantes) et le LCA (Toulouse) on a montré que l'utilisation de plastifiants réactifs permettait d'améliorer les propriétés mécaniques des films et leur résistance à l'eau. L'ensemble de ces travaux montrent, comme pour les autres propriétés fonctionnelles, l'existence de relation structure/fonction. Le développement de biopolymères protéiques adaptés passent donc par des travaux qui visent à mieux comprendre ces relations et à faire exprimer par la plante les protéines les plus appropriées pour ces utilisations.

✓ *Pour améliorer leurs propriétés fonctionnelles*, des études importantes ont été menées sur la modification enzymatique de ces protéines (pois et de soja), soit par hydrolyse ménagée, soit par réticulation. Les objectifs sont multiples : par hydrolyse ménagée il s'agit de produire des hydrolysats possédant soit des propriétés nutritionnelles adaptées à des applications spécifiques, souvent en nutrition clinique, soit des propriétés techno-fonctionnelles particulières. En effet on peut favoriser la production par hydrolyse de polypeptides dont la fonctionnalité est supérieure à celle de la protéine d'origine. Ces études concernent essentiellement les protéines de soja. A côté des protéases, d'autres enzymes ont été étudiées pour modifier les propriétés fonctionnelles des protéines. Parmi celles-ci, les transglutaminases se sont avérées très performantes pour former des gels et des réseaux à partir de protéines de soja ou de pois. Les recherches sur les potentialités de ces enzymes nouvelles en technologie alimentaire sont principalement effectuées au Japon (Univ; Kyoto).

Dans le cadre des utilisations non-alimentaires des protéines, des recherches ont été développées sur l'influence des modifications chimiques des protéines sur leurs propriétés fonctionnelles. Les protéines de légumineuses (pois, féverole, soja) sont des protéines qui possèdent une très bonne réactivité chimique à cause de leur teneur élevée en lysine. La fonction  $\epsilon\text{-NH}_2$  de la lysine est un site privilégié pour les réactions d'acylation ou de glycosylation. Ces modifications ont une influence majeure sur la structure de ces protéines et induisent des variations très importantes de leurs propriétés fonctionnelles : augmentation des propriétés gélifiantes, accroissement des propriétés émulsifiantes et moussantes.

Les équipes reconnues dans ce domaine sont celles de l'Université de Potsdam (K.D. Schwenke), de ATO-DLO (Wageningen). Le groupe de l'INRA-Nantes a été pionnier dans ce domaine en France et a acquis depuis une dizaine d'années une expertise de niveau international sur le sujet.

#### Polysaccharides:

✓ Les propriétés fonctionnelles des amidons de légumineuses ont fait l'objet d'études relativement limitées. Il apparaît que la consistance des empois d'amidon à chaud est assez voisine pour amidon de pois et de blé, un peu supérieure pour les amidons de féverole. La principale différence avec les amidons de céréales est qu'au cours du refroidissement une rétrogradation des gels est observée à cause de la teneur élevée de ces amidons en amylose. Cette propriété est essentielle pour les nouilles chinoises à base d'amidon de haricot mungo (doré). Seuls les amidons de légumineuses donnent cette aptitude à la texturation. Ce caractère se double de la formation d'une forte cristallinité de type B, à l'origine d'une classification en amidon résistant. C'est l'une des voies envisagées pour enrichir l'alimentation humaine en amidon résistant. Ce thème a été largement exploré par des collaborations entre URPOI et LPCM (INRA Nantes) d'une part, le Food Research Lab de Norwich d'autre part. Les études antérieures ont permis d'analyser en détail les mécanismes de gélification de l'amylose et de l'amylopectine, et d'identifier les paramètres clés, et les valeurs critiques (température, concentration, constantes de cristallisation). Ces travaux sont à la base des développements technologiques qui visent à diversifier les produits disponibles.

✓ *La teneur relativement élevée en amylose des amidons de légumineuses est un avantage pour leur utilisation comme biopolymère dans la préparation de matériaux thermoplastiques. Cela confère de bonnes propriétés mécaniques aux matériaux.* En outre l'absence de lipides complexables, à la différence des céréales (acides gras du maïs, lysophospholipides du blé) élimine les réactions de complexation, à l'origine d'une mauvaise élasticité du matériau. Ces deux arguments expliquent l'utilisation fréquente de ces amidons de légumineuses dans des opérations de démonstration de matériaux. La compétitivité par rapport aux génotypes de maïs est assurée par les faibles rendements agronomiques des maïs riches en amylose.

Cette question est renforcée par la nécessaire plastification des polysaccharides dans les applications en matériaux. Pour un ratio amylose-amylopectine donné, les taux élevés d'incorporation d'agents plastifiants, nécessaires pour abaisser la température de transition vitreuse, entraînent de moindres propriétés mécaniques, une diminution des

modules d'élasticité compensables alors par la teneur en amylose. L'optimisation des propriétés mécaniques se ferait en deux temps : d'abord un contrôle de la température de transition vitreuse par l'addition de plastifiants, ensuite l'ajustement des propriétés mécaniques par la teneur en amylose.

La perméabilité aux gaz s'est avérée très compétitive par rapport aux polymères de synthèse tels que l'EVOH, meilleure barrière à l'oxygène à ce jour dans les polymères thermoplastiques. Des travaux en collaboration entre l'INRA-Nantes et l'Esiec à Reims sont en cours pour développer des films multicouches, avec deux films externes insensibles à l'eau entre deux films d'amidon très peu perméables à l'oxygène.

Des travaux récents de collaboration entre l'UBTP, Phytec (INRA Nantes) et le LCA (Toulouse) ont démontré l'intérêt pour les applications des mélanges amidon/protéine. Des objets 3D, possédant des propriétés mécaniques très satisfaisantes et une grande stabilité au vieillissement, ont été obtenus. Sur cette base, l'intérêt industriel de farine et concentré amylicé (turboséparation) de pois a été démontré. Les études sur les fibres de pois ont concerné presque exclusivement les téguments. Il apparaît que la capacité d'hydratation de ces fibres est assez faible comparée à celle des fibres d'autres origines. Ces propriétés peuvent être améliorées par des traitements chimiques.

#### ◆ **Recherches en cours en France et dans le monde**

Que ce soient avec des objectifs alimentaires ou non-alimentaires, la plupart des recherches dans le monde concerne les protéines de soja avec une suprématie des équipes américaines et japonaises. Sur le pois deux groupes de recherche sont actifs sur le sujet et sont impliqués dans un contrat européen (FAIR, EU-PEA Ingredients) : le John Innes Centre (Norwich, G.B) pour les aspects génétiques, ATO-DLO (Wageningen, NL) et dans une moindre mesure l'Université de Gembloux (B) sur les aspects fonctionnalité et transformation technologique.

**Au plan international**, il y a assez peu de recherches spécifiques en cours sur les propriétés fonctionnelles des polysaccharides (amidon, fibres) des graines protéagineuses. Ces travaux s'inscrivent en général dans des études comparatives entre polysaccharides de diverses origines botaniques.

**Au plan national**, l'INRA de Nantes a eu un rôle important et de pionnier dans ces recherches à la fois au plan cognitif dans l'étude des relations entre la structure des macromolécules et leurs propriétés physicochimiques et fonctionnelles, et au plan des potentialités d'utilisation dans les applications alimentaires et non-alimentaires. Le faible intérêt de la filière pour la transformation du pois en dehors du marché de l'alimentation animale a conduit progressivement les équipes à mettre en veille ces thèmes de recherche dans le cas des légumineuses.

L'étude des propriétés fonctionnelles des protéines que ce soit pour les applications alimentaires ou non-alimentaires se limite à quelques travaux sur la fraction albumine encore mal explorée.

Les résultats sur les propriétés biologiques de ces petites protéines semblent très prometteurs. Leurs retombées concernent non seulement la protection et la défense de la plante mais aussi les potentialités d'utilisation *in vitro* de ces protéines comme antifongiques ou bactéricides.

Les amidons de pois sont utilisés comme référence dans les travaux : l'absence de lipides complexables et une teneur médiane en amylose, entre les 20-27 % des génotypes normaux et les 50-60 % des génotypes riches en amylose, donnent un point central dans les études multiparamètres.

### ◆ **Commentaires et Perspectives**

Le pois lisse est une graine qui possède indéniablement des atouts comme matière première industrielle ; elle est relativement facile à décortiquer, se prête assez bien au broyage et aux technologies de fractionnement (turboséparation, extraction en milieu aqueux). et est dépourvue de constituants phénoliques. En outre, les constituants biochimiques de la graine présentent des potentialités fonctionnelles (amidon, protéines) et nutritionnelles (amidon résistant, fibres) assez spécifiques.

✓ *Le faible développement du pois comme matière première pour les industries de transformation s'explique par la situation très concurrentielle du marché des protéines (soja, gluten de blé) et de l'amidon (blé, maïs, pomme de terre, manioc) et reflète de surcroît une certaine frilosité des acteurs de la filière dans ce domaine.*

Favoriser une filière industrielle de transformation du pois suppose par conséquent de mieux démarquer cette graine des autres matières premières, céréales et soja, en ajustant sa composition par voie génétique pour mieux satisfaire les utilisations. Pour l'industrie du fractionnement la teneur globale en protéines doit être augmentée car les protéines constituent la fraction la mieux valorisée. En outre, cette teneur a un impact majeur sur le bilan économique du procédé de fractionnement. Sur le plan qualitatif, la fonctionnalité des macromolécules (protéines, amidon) doit être mieux ajustée aux utilisations, qu'elles soient alimentaires ou non alimentaires. Cela nécessite de pouvoir faire varier à dessein le rapport amylose/amylopectine et de surexprimer dans la graine les protéines fonctionnelles. L'étude plus approfondie des albumines peut être à ce titre très fructueuse car elles sont en quantité beaucoup plus importante dans le pois que dans le soja et leur fonction, biologique ou technologique, reste encore peu connue.

✓ L'organisation cytologique de la graine du pois, caractérisée par l'existence de corpuscules protéiques bien différenciés et préservés en tant qu'entité granulaire dans la graine mature, constitue aussi une spécificité de ces graines par rapport aux céréales. Cette caractéristique pourrait être mieux exploitée car ces corpuscules protéiques sont facilement séparés industriellement par turboséparation. Ces corpuscules pourraient ainsi constituer les organites privilégiés de la graine pour stocker des protéines fonctionnelles, endogènes ou non, à condition toutefois de maîtriser les processus d'adressage des protéines de réserve. D'autre part une amélioration significative du rendement de turboséparation pourrait être obtenue par une connaissance des processus d'adhérence entre granule d'amidon et corpuscule protéique.

✓ A cause de sa faible teneur en polyphénols, et de son aptitude au fractionnement, le pois apparaît comme une alternative au maïs pour la production de produits à haute valeur ajoutée (vaccins, enzymes industrielles) après transformation génétique. Des travaux sont engagés dans plusieurs organismes (CSIRO, IPK par exemple), cependant les surfaces emblavées seront toujours marginales pour ce type de production.

Au sein des matières premières agricoles peu transformées de type farines, le pois apparaît comme l'une des matières premières les mieux adaptées à la préparation de matériaux thermoplastiques à cause de sa composition biochimique et des propriétés de son amidon. Ce potentiel mériterait d'être précisé, en collaboration avec des partenaires industriels utilisateurs.

✓ Pour les utilisations nutritionnelles de la graine comme légume sec ou des fractions dérivées (farine, isolats, concentrats), la connaissance plus précise de la composition des fibres et de leur rôle physiologique est nécessaire ; en outre un abaissement significatif de la teneur en  $\alpha$ -galactosides constituerait un réel progrès.

Il apparaît donc que pour satisfaire ces objectifs, qu'ils soient nutritionnels ou fonctionnels, et que ce soit pour l'amidon, les parois végétales ou les protéines, une meilleure connaissance des voies de biosynthèse est indispensable si l'on veut mieux maîtriser la composition des graines. Faire varier à dessein le rapport amylose/amylopectine et le degré de cristallinité de l'amidon, la composition et l'organisation des parois végétales ou la composition en protéines représente un enjeu considérable et doit permettre de répondre tant aux objectifs de l'alimentation animale (digestibilité des constituants, balance énergie/protéines) qu'à ceux de l'industrie du fractionnement pour l'alimentation humaine (fractionabilité, propriétés fonctionnelles des constituants) ou la préparation de biomatériaux. L'existence d'un important polymorphisme des protéines complique très souvent la mise en œuvre des procédés de transformation. Produire des graines ayant une composition protéique moins complexe, plus homogène permettrait des utilisations industrielles mieux maîtrisées et simplifierait considérablement les procédés d'extraction et de fractionnement.

✓ Le développement de ces travaux sur des espèces modèles (*Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula*) pour les études de biologie et biochimie structurale paraît nécessaire mais il est insuffisant pour atteindre les objectifs liés à la transformation. L'enjeu est de comprendre sur des bases structurales plus claires les propriétés biologiques, nutritionnelles et fonctionnelles de ces macromolécules. Pour cela, une meilleure connaissance de la fonctionnalité des macromolécules aux différents niveaux d'organisation (moléculaire et supra moléculaire) dans la matière condensée, au sein même de ces systèmes transformés, est indispensable si l'on veut identifier les molécules (ou leurs domaines structuraux) clés dans l'organisation de ces systèmes (systèmes polyphasiques, interfaces, gels, matériaux, ...). Les outils de la biologie moléculaire doivent permettre par la mutagenèse dirigée de mieux cerner les relations structure/fonction dans le cas des protéines. L'apport des méthodes spectroscopiques (RMN du solide) et microscopiques pourra aider à la compréhension de l'organisation mésoscopique des systèmes. En complément de la génomique et de la protéomique, ces informations sont incontournables pour orienter les travaux de génétique. Une approche complémentaire mais probablement aussi lourde, est de générer du matériel génétique particulier pour examiner le rôle fonctionnel de telle ou telle macromolécule. Pour toutes ces recherches ayant des objectifs de valorisation, le matériel biologique étudié doit impérativement être la graine (ou la plante) d'intérêt économique et donc pour ce qui nous concerne principalement le pois.

#### ◆ **Références Bibliographiques**

- ✓ CASEY R, DOMONEY C, SMITH AM. 1993. Biochemistry and molecular biology of seed products. In: Casey R, Davies DR, eds. Peas: genetics, molecular biology and biotechnology. Wallingford: CAB International, 121-63.
- ✓ DAVIN A., BEROT S., Technologie de préparation de produits enrichis en protéines végétales destinés aux consommateurs. Dans "Protéines Végétales" Ed . B. Godon, Lavoisier
- ✓ DELLA VALLE G. , COLONNA P., PATRIA A. et VERGNES B. Influence of amylose content on the viscous behaviour of low hydrated molten starches. *J. Rheol.* **40**: 347-362. 1996.
- ✓ GATEL F., CHAMP M. (1998) Grain legumes in human and animal nutrition – up to date results and questions marks. Proceedings of the 3<sup>rd</sup> European Conference on Grain Legumes. P. 7-11.
- ✓ GUEGUEN J., CERLETTI P., Legume seeds proteins. In "New and developing sources of food proteins". Ed. B.J.F. Hudson. Chapman & Hall, London, 1994, 6, 145-193.

- ✓ LOURDIN D., DELLA VALLE G., COLONNA P. Influence of amylose content on starch films and foams. *Carbohydrate Polymers* **27**: 261-270. 1995.
- ✓ NIEDDU M., BLIARD C., COLONNA P., de LOOZE M-A Biopolymères et Agromatériaux : les entreprises prennent position. *Industries Alimentaires et Agricoles*, 52-59, Nov-déc. 1999.
- ✓ NOAH L., GUILLON F., BOUCHET B., BULEON A., MOLIS C., GRATAS M., CHAMP M. (1998). Digestion of carbohydrates from white beans (*Phaseolus vulgaris L.*) in healthy humans. *J. Nutr.* **128**, 977-985.
- ✓ PLANCHOT V., GERARD C. et COLONNA P. Les amidons modifiés génétiquement. *Biofutur* 40-43, 192. 1999.
- ✓ VIROBEN G, BARBOT J., MOULOINGUI Z., GUEGUEN J., 2000, Préparation and characterization of films from pea protein. *J. Agric Food Chem.*, 48, 1064-1069.

#### ◆ **Sites Web**

- ✓ <http://www.ato.dlo.nl/ato/Base/BaseFrames.asp?lan=en&BuId=0>
- ✓ <http://www.biochem.purdue.edu/~plantbiology/faculty/Nielsen.html>
- ✓ <http://ifse.tamu.edu/index.cfm?PageID=17>
- ✓ <http://www.ag.iastate.edu/centers/ccur/>

#### ◆ **Laboratoires connus**

- ✓ INSTITUTE OF FOOD RESEARCH, Norwich laboratory, Colney Lane, Norwich S. Ring)
- ✓ ATO-DLO, PB17, 6700 AA Wageningen NL (H Langelaan)
- ✓ UNIVERSITÄT POTSDAM, Forschungsgruppe Pflanzenproteinchemie, C/o Arthur Scheunert Alle 114-116., D 14558 Bergholz-Rehbrücke (K.D. Schwenke)
- ✓ Iowa State university of Science and technology, Center for crops utilization research, 1041 Food Science Building, Ames, Iowa 50011-1061, USA (L.A. Johnson)
- ✓ Purdue University, Department of Biochemistry, 1153 Biochemistry Building, West Lafayette, IN 47907-1153, USA, (N. Nielsen)
- ✓ INRA: Centre de Nantes (UFDNH, URPOI, UBTP)

## **5. CONCLUSION**

## CONCLUSION

### ◆ *Bilan*

*L'examen des résultats de la recherche effectuée au cours des deux dernières décennies indique un bilan des connaissances acquises sur les protéagineux important, même s'il est inégal suivant les espèces.* On observe une forte prédominance des recherches sur le soja à l'échelle mondiale, mais aussi une part significative des études sur le pois et le haricot. En Europe de l'Ouest et en France l'essentiel de l'effort de recherche concerne le pois, quelles que soient les disciplines concernées, et le soja tout particulièrement pour les études en alimentation animale. Les travaux sur les autres espèces (féverole, lupin, haricot) sont plus anciens et plus limités.

Ces recherches ont largement contribué à démontrer pour la culture du pois, encore inexistante il y a 20 ans, un réel potentiel agronomique et une aptitude à la transformation pour l'alimentation humaine et animale. Des progrès importants se traduisant par des augmentations significatives des rendements et des améliorations très sensibles des conduites culturales ont accompagné le développement de cette culture. Ils sont indéniablement le fruit de recherches soutenues depuis plus de dix ans en agronomie et physiologie sur la formalisation de la phénologie, l'acquisition du carbone et de l'azote, le transfert des assimilats et le développement de la graine, en pathologie sur l'étude des bioagresseurs et la gestion des résistances, en génétique sur l'architecture de la plante. Dans le domaine de la transformation, le pois s'est affirmé comme une matière première concurrentielle pour l'alimentation animale (en particulier du porc) grâce aux travaux importants en biochimie et en génétique sur la composition des graines, en alimentation animale et en transformation sur la valeur nutritionnelle des constituants en fonction de divers traitements technologiques.

La contribution de la recherche française au développement des protéagineux en Europe mesurée par le nombre de références publiées dans le domaine apparaît significative puisqu'elle représente environ 15 % de l'effort total de recherche en Europe sur les protéagineux.

Pourtant les progrès en agronomie, en génétique ou ceux concernant la transformation et la valeur d'usage de ces productions ne permettent pas d'assurer aujourd'hui une place prépondérante des protéagineux dans les cultures européennes. *La situation de concurrence défavorable pour le pois nécessiterait que des progrès rapides soient enregistrés quant aux rendements et à la qualité pour maintenir de manière durable cette culture à un niveau de production satisfaisant.*

### ◆ *Perspectives scientifiques*

#### • *Des domaines à explorer*

Il faut reconnaître que les avancées scientifiques les plus faciles ont été faites et que seule une politique de recherche plus ambitieuse accompagnée d'une volonté politique déterminée peut permettre d'affirmer le pois comme une grande culture européenne, ayant une place reconnue dans les rotations pour ses spécificités agronomiques et une position concurrentielle par rapport au soja et aux céréales sur le marché des matières premières. L'une des conditions pour réaliser ces progrès serait de combler le déficit important de connaissances qui existe dans certains domaines concernant aussi bien le fonctionnement de la plante en interaction avec son environnement que l'élaboration de la graine, sa qualité et son aptitude à la transformation. *Sans être exclusif, quelques uns de ces domaines particulièrement importants peuvent être mentionnés :*

- ✓ La nutrition azotée, l'acquisition de l'azote et sa valorisation par la plante conditionnent le rendement et la qualité de la graine ainsi que les effets de la culture sur la rémanence de l'azote dans les sols. L'absence de fertilisation azotée sur les légumineuses implique une prise en compte particulière de la variabilité génétique des fonctions de prélèvements de l'azote et de leur interaction avec l'environnement. Il paraît essentiel dans le cadre d'une agriculture raisonnée de mieux exploiter ce potentiel spécifique des légumineuses ;
- ✓ L'influence des stress hydrique et thermique mais aussi des stress biotiques sur le développement de la plante devrait être considérée en prenant en compte non pas le seul territoire français mais l'ensemble des conditions climatiques européennes pour élargir les zones de culture et faire du pois le protéagineux des pays européens ;
- ✓ L'analyse des facteurs de développement épidémiques des bioagresseurs, en s'appuyant délibérément sur la compréhension mécaniste des processus biologiques qui gouvernent les relations plante/parasites mais aussi graine/parasites, doit permettre d'améliorer d'une part, la conception et la mise en œuvre de la lutte fongicide et d'autre part, la recherche des résistances partielles de la plante, et donc le rendement, et la qualité des semences ;
- ✓ La maîtrise des voies de biosynthèse et de leur contrôle, la connaissance des mécanismes de régulation, que ce soit pour l'amidon, les protéines ou les parois végétales, est essentielle pour améliorer la composition de la graine, la rendre moins complexe, moins variable et donc plus apte aux utilisations ;
- ✓ L'évaluation de nouvelles voies de valorisation des protéagineux doit être entreprise, soit pour favoriser l'usage des graines en alimentation humaine (marché export) , soit pour élargir les domaines d'utilisation en alimentation animale (volailles, filières label, filière non-OGM), soit encore pour exploiter les propriétés fonctionnelles particulières des constituants (amidon, fibres, protéines) dans de nouvelles formulations alimentaires ou non-alimentaires ;
- ✓ La définition de critères de qualité simples, plus facilement exploitables par les généticiens, nécessite une connaissance plus approfondie des bases structurales des macromolécules qui gouvernent les propriétés nutritionnelles en alimentation animale ou humaine et leurs caractéristiques fonctionnelles.

- *De nouvelles approches à développer*

Le bilan effectué montre que chacune de ces grandes thématiques a déjà fait l'objet de recherches par le passé et que les apports de la génétique ont été essentiels dans l'amélioration des performances agronomiques du pois. Mais ce bilan montre aussi que les approches traditionnelles de type « boîte noire » ont atteint très probablement leurs limites et sont insuffisantes pour faire sauter les verrous qui freinent le développement du pois (rendements, qualité). *Pour être plus performantes, les approches devront donc être à la fois plus mécanistes, et plus intégratives.*

### **1. La génomique**

Le développement de la génomique, et notamment de la génomique fonctionnelle en liaison avec la protéomique différentielle, va profondément modifier la biologie végétale dans les années à venir. Jusqu'à maintenant la recherche agronomique a, dans le secteur végétal, été cloisonnée entre approches génétiques, approches physiologiques, approches agronomiques et transformation. La génomique fonctionnelle, en bénéficiant des avancées de la bioinformatique, devrait permettre le développement d'approches intégrées tenant compte du fonctionnement de réseaux de gènes dans des conditions de cultures en peuplement et favoriser l'étude des processus multifactoriels très complexes telle que la qualité des produits. Ces approches doivent être développées sur les protéagineux sous peine de voir les écarts de rendement avec les céréales se creuser encore. En particulier, la meilleure connaissance du fonctionnement de la plante entière et la plus grande maîtrise des processus de biosynthèse

spécifiques des légumineuses doivent être mises à profit pour conforter le positionnement des protéagineux comme facteur de développement d'une agriculture durable. Ces progrès scientifiques doivent aussi permettre d'améliorer et d'adapter les propriétés nutritionnelles et technologiques des molécules produites dans la graine. L'étude du protéome à différents stades de développement de la plante ou de divers organes, doit apporter par la mise en évidence de protéines et/ou de fonctions nouvelles des éclairages nouveaux sur les processus de biosynthèse et les voies métaboliques.

Les travaux engagés en génomique fonctionnelle sur les plantes modèles (*Arabidopsis*, *Medicago truncatula*) peuvent nous aider considérablement dans cette voie, à condition cependant (i) de transférer les connaissances acquises sur le pois et (ii) d'intégrer les différentes disciplines. Ces approches devraient être facilitées par la proximité phylogénétique de *Medicago* et de *Pisum*, par les programmes de cartographie du génome du pois et enfin par la connaissance de nombreux marqueurs de gènes de fonction connue. Même si la transformation du pois reste encore difficile, cela implique la préparation de matériel d'étude spécifique, y compris de plantes transformées, que ce soit pour l'étude du fonctionnement de la plante ou pour examiner les potentialités nutritionnelles et fonctionnelles des constituants des graines.

Pour progresser il semble aussi nécessaire de promouvoir des approches qui abordent à des échelles d'intégration différentes l'étude de mécanismes biologiques, physiologiques, moléculaires intervenant au cours du développement de la plante et de l'élaboration de la graine. L'INRA à travers son acquis, qui transparaît d'évidence dans le présent document, par sa capacité à étudier et intégrer les phénomènes à différentes échelles et en s'appuyant sur les travaux relatifs à *Medicago*, pourrait jouer un rôle moteur dans ces recherches pour promouvoir les légumineuses en Europe, dans le système de rotation des grandes cultures, à un niveau comparable à celui du soja en Amérique du Nord. Les enjeux agronomiques, environnementaux, économiques d'une telle stratégie mériteraient d'être examinés.

## **2. La post génomique et la biologie structurale**

Les apports de la génomique, même s'ils doivent être considérables par l'identification des gènes ou des réseaux de gènes impliqués dans les processus biologiques, seront souvent insuffisants pour maîtriser ou modifier à la fois les facteurs de développement de la plante en interaction avec son environnement et/ou les voies métaboliques de biosynthèse. Pour limiter les approches « boîtes noires », seule la connaissance fine des molécules et de leur rôle, de leur mécanisme d'action peut permettre d'identifier les étapes clés des processus biologiques. Pour faire bénéficier pleinement les protéagineux des avancées de la génomique, il est aussi nécessaire d'identifier les verrous qui freinent les usages, et surtout de les analyser à un niveau de connaissances tel qu'ils puissent être intégrés aux objectifs finalisés de la biologie végétale. Cela suppose que les recherches dans le domaine nutritionnel, fonctionnel ou technologique, aient pour ambition d'identifier ces facteurs qui freinent l'utilisation ou la transformation de manière plus analytique à l'échelle des molécules, de leurs organisations dans la cellule, de leur localisation dans les tissus ou enfin de leurs interactions dans la matière première ou dans le produit transformé. Une telle approche permettrait de progresser dans la définition pour les protéagineux d'un cahier des charges en fonction des utilisations, en particulier pour l'alimentation animale, et qui soit facilement exploitable par les biologistes et les généticiens.

Il paraît donc essentiel d'engager dès maintenant des approches post-génomique, faisant appel à la biochimie et biologie structurales pour élucider ces mécanismes biologiques ou physiologiques ou encore faire produire à la plante des graines dont la composition soit mieux adaptée aux utilisations et/ou à la transformation technologique. Les légumineuses présentent de ce point de vue des spécificités qui méritent d'être étudiées. L'état de la recherche que

nous avons effectué, montre que le retard accumulé dans ce domaine sur les protéagineux est considérable comme d'une manière assez générale dans le secteur végétal.

### 3. *La biologie intégrée*

Un effort important visant à formaliser des événements biologiques a été réalisé ces dernières années aussi bien en agronomie qu'en santé des plantes. Les modèles avaient pour objectif de décrire le fonctionnement d'une plante et d'un couvert végétal en conditions potentielles de rendement, de décrire le développement d'une épidémie sur la plante et dans un couvert, et enfin, de formaliser le fonctionnement d'une plante et d'un couvert en conditions potentielles et sous conditions limitantes provoquées soit par une maladie, soit par une contrainte abiotique (déficit en eau notamment). Ces approches de biologie intégrée présentent un intérêt incontestable dans la mesure où en décrivant un phénomène complexe, elles contribuent à la compréhension des processus conduisant au rendement ou au développement d'une épidémie. Outre l'intérêt de formalisation des connaissances mécanistes acquises par chacune des disciplines, le développement de ces approches constitue des plateformes de travaux pluridisciplinaires (bioclimatologie, physiologie, écophysiologie, agronomie, pathologie, génétique) grâce auxquelles les interactions entre mécanismes constituant chaque système ainsi que les celles observées entre systèmes peuvent être étudiées.

Par ailleurs, d'autres modèles en cours d'élaboration, visent à apporter soit des éléments de diagnostic cultural, soit des éléments de prévision de pertes de rendement dues à des contraintes biotiques ou abiotiques ou de risque de développement épidémique. Ces modèles sont d'une importance capitale pour la valorisation de nos recherches auprès des groupements de producteurs, ou bien auprès du Service de la Protection des Végétaux.

L'aspect intégratif de la démarche présente un intérêt tout à fait original et fondamental dans la mesure où dans le monde, cette approche mécaniste et synthétique est quasi unique et qu'elle constitue un cadre scientifique novateur et prometteur pour l'étude des interactions au sein du champ cultivé (milieu et microclimat, plante caractérisée par son génome, pathogènes).

#### ◆ *Débats ...*

Si l'on peut identifier sur la base de ce bilan certaines lacunes mais aussi de réels enjeux scientifiques pour les années futures, les objectifs finalisés de ces recherches font souvent l'objet de débats animés.

Pour consolider, voire renforcer, la place du pois dans les productions de grande culture, il conviendrait en effet de rendre cette culture à la fois plus compétitive sur le marché des matières premières par rapport aux céréales et au soja et plus attractive pour l'agriculteur en accroissant la marge brute escomptable au niveau des cultures concurrentes (principalement céréales).

Cela ne peut s'opérer que :

- ✓ par un maintien, ou mieux une augmentation, du rendement relatif du pois par rapport au blé, sans abaissement de la teneur en protéines ;
- ✓ par le renforcement des atouts agronomiques de la culture de manière à i) promouvoir son positionnement dans des systèmes de cultures favorisés dans le cadre d'une agriculture durable, ii) élargir sa zone de culture à l'ensemble des pays de l'Europe de l'Ouest ;
- ✓ par l'amélioration qualitative de la graine en lui conférant des caractéristiques nutritionnelles et/ou fonctionnelles améliorées et qui la différencie plus nettement à la fois du soja pour sa fraction protéique et des céréales pour l'amidon.

Or, suivant que l'on décline la notion d'agriculture durable dans un système intensif ou au contraire plus extensif, les thématiques de recherche à privilégier peuvent être différentes. L'une des alternatives la plus souvent discutée est aussi celle de produire un pois très riche en

protéines, trouvant de nouveaux débouchés en alimentation des volailles et dans la filière industrielle de transformation ou celle de développer un pois à haut rendement plus riche en amidon et à teneur en protéines plus faible. La place du pois dans une filière « non OGM » par opposition au soja est aussi une question largement débattue. Les programmes de recherche à privilégier sont d'évidence très différents suivant que l'on adopte l'un ou l'autre de ces scénarii et chaque hypothèse mérite d'être approfondie pour définir les orientations les plus stratégiques.

## **ANNEXES**

## **Annexes**

### **En détail**

#### **L'activité de l'INRA dans la filière Protéagineux Période 1995-1999**

**Les fiches de recherches des départements :**

- **Les thèmes et les moyens**

## **Environnement et Agronomie**

## INRA - Groupe Filière Protéagineux

### Inventaire des programmes de recherches pour la période 1995-1999

#### Intitulé du Programme de Recherche :

**ETUDE DU FONCTIONNEMENT DE PEUPEMENT DE LEGUMINEUSES ANNUELLES A GRAINES.**

#### Objectifs :( 5 lignes)

Nos études sur le fonctionnement de légumineuses comportent des activités analytiques et intégratrices utiles à la constitution d'un modèle dynamique de l'élaboration de leur rendement quantitatif et qualitatif. Pour cela 3 grands thèmes sont abordés : i) l'acquisition du carbone et de l'azote par la plante, ii) la morphogenèse et la croissance des puits, et iii) l'intégration de ces connaissances à l'échelle de la plante et du peuplement grâce à la définition de règles de répartition des flux.

#### Equipes

Intitulé des Unités	Dept		Statut et nombre de chercheurs /an *				
			1995	1996	1997	1998	1999
Unité de Malherbologie et Agronomie. Equipe d'Ecophysiologie de Dijon	EFA	INRA	3	3	3	2	2
		Thésards	1	1	1	1	2
		Post-doc CDD					1
Unité d'Agronomie INRA-INA P-G de Grignon	EFA	INRA	0.5	0.5	0.1	0.1	0.1
		Thésards	1	1			
		Post-doc CDD					
		INRA					
		Thésards					
		Post-doc CDD					

#### Contrats sur la période 1995-1999

Equipe INRA contractante	Partenaires professionnels	Partenaires « recherche »	Origine du financement	Période
Ecophysiologie Dijon	UNIP, ITCF, sélectionneurs	INRA GAP	MAP	1994-1997
INRA-INA P-G	UNIP	INRA Dijon	UNIP	1993-1996
Ecophysiologie Dijon	Biopôle, ITCF		SIDO, Région Picardie	1995-1999
Ecophysiologie Dijon		INRA GAP	Région Bourgogne	1996-1999
Ecophysiologie Dijon	UNIP		UNIP	1997-2000

#### Autres collaborations nationales et internationales sur le thème :

INRA Physiologie Versailles  
 INRA GAP Epoisses, Mons  
 CNRS Montpellier  
 GeoSol, Université de Bourgogne  
 Risø National Laboratory, Danemark

## Résultats majeurs : (15-20 lignes)

### Pour le pois :

- Modélisation du développement reproducteur : un schéma rendant compte de la phénologie a été proposé. Des constantes de développement (fonction de la température et de la photopériode) ont été mises en évidence. Les variables « date de floraison » et « nombre de nœud fructifères » ont été modélisées en fonction du climat et des caractéristiques génotypiques de développement.
- Modélisation de la croissance globale du peuplement : les variations au cours du temps de l'efficacité de conversion du rayonnement en matière sèche aérienne ont été analysées. Il a été montré que ces variations n'étaient pas imputables à une forte allocation de matière sèche aux racines, mais étaient plutôt dues à une stimulation de la croissance par la présence de puits reproducteurs forts.
- Modélisation de la variabilité du profil de nombre de graines
- Analyse du déterminisme du potentiel de croissance d'une graine : le puits graine constitue un puits prioritaire pour les assimilats. Le potentiel de croissance d'une graine (vitesse de croissance et taille maximale) a été mis en relation avec le nombre de cellules cotylédonaire.
- Modélisation de l'accumulation d'azote dans les graines : contrairement à l'accumulation de carbone, la vitesse d'accumulation d'azote dans une graine est sous la dépendance de la disponibilité en azote dans la plante pendant le remplissage. Des règles de répartition de l'azote vers les graines ont été définies.

### Pour le lupin :

- Modélisation de la structure du peuplement et de la production de graines : accumulation de biomasse, déterminisme du nombre de feuilles et de la floraison, phénologie, règles de répartition des assimilats pour la production de graines.

## Travaux en cours (5 lignes)

- Quantification de l'accumulation d'azote provenant de la fixation symbiotique ou de l'assimilation. Etude de l'impact environnemental sur ces voies.
- Etudes des règles de répartition des flux de C et N dans la plante, en particulier entre la partie aérienne et le compartiment racinaire.
- Déterminisme du nombre de cellules de l'embryon en fonction de son environnement trophique et physique.

## Perspectives (5 lignes)

- Formalisation de l'architecture par une approche L-System (relation avec la Bioclimatologie de Grignon) permettant d'intégrer au sein du peuplement les règles de circulation des assimilats déterminées en conditions contrôlées en tenant compte de l'environnement physique au sein du couvert.
- Intégration des modèles écophysologiques au sein d'autres disciplines, en particulier en génétique pour l'évaluation des génotypes, la conception d'idéotypes, le choix de caractères pertinents pour la sélection (QTL).

## Situation de la Recherche : (5 -10 lignes)

- **au plan national** (mentionner si d'autres organismes que l'INRA s'implique dans ce domaine - CNRS, Université, structure privée)

ESA Angers

UNIP service technique : test des modèles, conception d'itinéraire technique

- **au plan Européen**

John Innes Center : développement de la graine, accumulation de réserves.

Department of Agriculture, University of Reading : croissance et surtout développement reproducteur.

Risø, Danemark : gestion de l'azote dans les systèmes de cultures comportant des protéagineux.

- **au plan mondial**

CLIMA, Australie

USDA, USA

### - Positionnement des équipes INRA dans le contexte international

L'approche proposée par les agronomes ne se retrouve pas en l'état dans la recherche internationale en agronomie, qui est souvent plus dépendante de la génétique pour ce qui concerne l'analyse en peuplement ou plus proche de la biochimie pour ce qui concerne le fonctionnement mécaniste de la plante. Cependant l'utilisation d'approches plus physiologiques dans la conception des modèles devrait permettre aux agronomes de mieux mettre en valeur leur approche originale au sein de la communauté scientifique internationale.

### Remarques Générales :

### Publications récentes (5-10)

#### ARTICLES DANS REVUES A COMITE DE LECTURE

- (1) Munier-Jolain N.G., Ney B., Duthion C., 1996. Termination of seed growth in relation to nitrogen content of vegetative parts in soybean plants. *Eur. J. Agron.*, 5, 219-225.
- (2) Munier-Jolain N.M., Ney B., Duthion C., 1996. Analysis of branching in spring-sown lupins (*Lupinus albus* L.) : the significance of the number of axillary buds. *Ann. Bot.*, 77, 123-131.
- (3) Munier-Jolain N.M., Ney B., Duthion C., 1997. Analysis of sequential reproductive development in white lupin cv Lublanc. *Aust. J. Agric. Res.*, 48, 913-922.
- (4) Roche R., Jeuffroy M.H., Ney B., 1998. A model predicting the final number of reproductive nodes in pea (*Pisum sativum* L.). *Ann. Bot.*, 81, 545-555.
- (5) Munier-Jolain N.G., Munier-Jolain N.M., Roche R., Ney B., Duthion C., 1998. Seed growth rate in grain legumes. I : Effect of photoassimilate availability on seed growth rate. *Journal of Experimental Botany*, 49, 1363-1369.
- (6) Munier-Jolain N.G., Ney B., 1998. Seed growth rate in grain legumes. II : Seed growth rate depends on cotyledon cell number. *Journal of Experimental Botany*, 49, 1371-1376.
- (7) Lhuillier-Soundélé A., Munier-Jolain N.G., Ney B., 1999. Seed N concentration of pea at a nodal position depends on N source-sink ratio during its filling period. *Accepté à European Journal of Agronomy*.
- (8) Lhuillier-Soundélé A., Munier-Jolain N.G., Ney B., 1999. Influence of nitrogen availability on seed nitrogen accumulation in pea. *Accepté à Crop Science*.

#### THESES

- (9) Munier-Jolain N.M., 1996. Analyse et modélisation de la structure du peuplement et de la production de graines chez le lupin blanc (*Lupinus albus* L.) de printemps. Effets de la date et de la densité de semis. Thèse de doctorat de l'INA-PG.
- (10) Roche R., 1998. Modélisation de la variabilité des profils de nombre de graines associée à la séquentialité du développement chez différents génotypes de pois protéagineux de printemps. Thèse de doctorat de l'INA-PG.
- (11) Lhuillier-Soundélé A., 1999. Analyse de l'élaboration de la teneur en azote des graines chez le pois (*Pisum sativum* L.). Modélisation de la répartition de l'azote vers les graines en remplissage. Thèse de doctorat de l'INA-PG.

## INRA – Groupe Filière Protéagineux

### Inventaire des programmes de recherches pour la période 1995-1999

**Unité : LEPSE – INRA – Agro Montpellier**

**Coordonnateur : J. Lecoeur**

Septembre 1999

#### Intitulé du programme de recherche

**MODELISATION DU FONCTIONNEMENT D'UN COUVERT DE POIS PROTEAGINEUX EN CONDITIONS HYDRIQUES, THERMIQUES ET RADIATIVES FLUCTUANTES**

#### Objectifs :

Notre objectif est d'analyser les effets des contraintes hydriques et thermiques sur les bilans d'eau et de carbone d'un couvert de pois pour cela nous avons entrepris de :

- (i) modéliser la croissance foliaire d'un couvert de pois en situations environnementales fluctuantes pour prévoir l'évolution de l'efficacité d'absorption au cours du cycle.
- (ii) modéliser les effets des contraintes hydriques et thermiques (hautes températures) sur la production de biomasse via l'efficacité biologique et sur la consommation en eau du couvert.
- (iii) modéliser avec un bilan d'énergie la température des différents organes d'une plante (stipules, entre-nœuds, gousses et graines) quelle que soit leur position dans le couvert pour prévoir leur dynamique de développement.

#### Equipes

		STATUT ET NOMBRE DE CHERCHEURS / AN*				
Intitulés des Unités	Dept	1995	1996	1997	1998	1999
LEPSE	EA	2	2	2	1,25	1,25

#### Contrats sur la période 1995-1999

Equipe INRA contractante	Partenaires professionnels	Partenaires « recherche »	Origine du financement	Période
LEPSE / Agro Montpellier	UNIP	INA-PG INRA Grignon Bioclimatologie	UNIP	09/97-08/99
LEPSE / Agro Montpellier	GSP ITCF	INRA Mons	MAE	01/94 – 09-96

#### Autres collaborations nationales et internationales sur le thème :

Agronomy Physiology Laboratory – USDA ARS – University of Florida (Thomas R. Sinclair) : Croissance foliaire, bilan carbone et azote en fin de cycle. Visite de chercheurs et échanges d'étudiants (1995 à 1999).

INRA Agronomie de Grignon (Bertrand Ney) : Modélisation du fonctionnement du pois. Développement d'un modèle de fonctionnement du pois en collaboration avec l'UNIP (Véronique Biarnès).

INRA Agronomie de Dijon (A développer) : Modélisation des températures d'organes et notamment des graines.

## Résultats majeurs

Les résultats majeurs concernent les réponses du pois protéagineux aux contraintes hydriques et thermiques, mais aussi la formalisation du développement et de la croissance foliaire en conditions environnementales fluctuantes. Outre des progrès sur la connaissance du fonctionnement d'un couvert de pois qui ont pu être transposés sur d'autres espèces (tournesol, haricot, pois chiche, cotonnier...), ces travaux ont abouti au développement de modules de simulation qui sont progressivement intégrés dans un modèle de fonctionnement du pois, dont une des applications est le logiciel AFILA (ITCF, UNIP, Agro Montpellier, INRA). Les modules développés concernent le développement foliaire, la croissance foliaire, le bilan hydrique et la température des organes. Le module de développement végétatif des phytomères du pois décrit, en fonction du temps thermique, la production des phytomères par le méristème terminal, leur émission et la fin de leur expansion (réf. 4). La chronologie du développement des différents organes est peu affectée par une contrainte hydrique ou thermique (réf. 5). Ce modèle a été validé sur une large gamme de variétés de pois de printemps utilisés en France (contrat de branche MAE UNIP). Le module d'expansion foliaire prévoit la réduction par un stress hydrique de la surface de toutes les feuilles en expansion (réf. 2 et 3). Pour cela la croissance des feuilles a été séparée en deux phases, une phase d'expansion lente correspondant essentiellement aux divisions cellulaires et une phase d'expansion rapide correspondant à l'expansion cellulaire (réf. 1). Le module de bilan hydrique du pois est basé sur une analogie réservoir à deux compartiments, avec un rétrocontrôle entre l'état hydrique du sol et la transpiration (réf. 2). La transpiration du couvert et l'évaporation du sol sont calculées séparément. Ce module a été validé dans le cadre du contrat de branche (MAE UNIP) sur le réseau d'essais multilocaux ITCF. Le module de prévision de la température, à pas de temps horaire ou journalier, a été développé par Lydie Guilioni en 1998 et 1999 en utilisant un bilan d'énergie. Ce modèle qui n'est pas encore publié, est extrapolable à tous les organes de la plante. L'effet des contraintes hydriques et thermiques sur l'efficacité biologique a été modélisé, mais pas encore publié. Il faut, au préalable, mieux formaliser l'évolution de cette variable en l'absence de contrainte (réf. 6). Dans l'objectif d'intégrer sur le cycle la réponse de la plante et de prévoir l'évolution de l'efficacité d'absorption sur le cycle, il a été nécessaire de s'intéresser à la fin de cycle et, notamment aux bilans de carbone et d'azote en fin de cycle ce qui a donné lieu à une étude du déterminisme des indices de récolte de l'azote et du carbone en cours de publication (réf. 7 à 10).

## Travaux en cours

En terme de recherche, la spatialisation des modules développés est en cours à l'aide de maquettes 3D (collaboration LEPSE - CIRAD AMAP) pour le bilan radiatif et le bilan d'énergie afin de construire de plantes virtuelles en interactions avec leur environnement pour la température et le rayonnement. Cette action est menée en parallèle sur le tournesol. Une part importante de notre activité est la valorisation des acquis de ces 5 dernières années dans le cadre de développement d'outils multimédia tels que le logiciel AFILA et le CD-rom PISUM (convention UNIP - ITCF - Agro Montpellier).

## Perspectives

Notre objectif à court terme (2 ans) est de finaliser la construction de maquettes numériques en interactions avec leur environnement pour la température et le rayonnement et d'y intégrer ensuite les aspects hydriques et la photosynthèse. Ceci devrait nous permettre de mieux prévoir l'évolution de l'efficacité d'absorption au début du cycle et de mieux comprendre les variations de l'efficacité biologique au cours du cycle.

## Publications récentes :

1. Lecoer, J., J. Wery, O. Turc et F. Tardieu. 1995. Expansion of pea leaves subjected to short water deficit : Cell number and cell size are sensitive to stress at different periods of leaf development. *Journal of experimental Botany*. 46:1093-1101.
2. Lecoer, J. et T.R. Sinclair. 1996. Field pea (*Pisum sativum* L.) transpiration and leaf growth in response to soil water deficits. *Crop Science*. 36:331-335.
3. Lecoer J., J. Wery et T.R. Sinclair. 1996. Model of leaf area expansion on field pea (*Pisum sativum* L.) plants subjected to soil water deficits. *Agronomy Journal*. 88:467-472.
4. Turc, O. et J. Lecoer. 1997. Leaf primordium initiation and expanded Leaf production are co-ordinated through similar response to air temperature in pea (*Pisum sativum* L.). *Annals of Botany*. 80:265-273.
5. Lecoer, J. et L. Guilioni. 1998. Rate of leaf production in response to soil water deficits in field pea. *Field Crop Research*. 57 :319-328.

6. Lecoeur, J. et B. Ney. 2000. Change time with in potentiel radiation-use efficiency in field pea. Field Crop Research. *Soumis*.
7. Lecoeur, J. et T.R. Sinclair. 2000. Harvest index increase during seed growth of field pea. Field Crop Research. *Soumis*.
8. Lecoeur, J. et T.R. Sinclair. 2000. Nitrogen accumulation and partitioning during seed-fill of field pea. Field Crop Research. *Soumis*.
9. Lecoeur, J. et T.R. Sinclair. 2000. Nitrogen harvest index increase during seed growth of field pea. Field Crop Research. *Soumis*.
10. Lecoeur, J. et T.R. Sinclair. 2000. Analysis of nitrogen partitioning in field pea plants resulting in linear increase in nitrogen harvest index. Field Crop Research. *Soumis*.

## **Biologie Végétale**

## INRA - Groupe Filière Protéagineux

### Inventaire des programmes de recherches pour la période 1995-1999

**Intitulé du Programme de Recherche :**

**COMPREHENSION DE LA MISE EN RESERVE DANS LES GRAINES**

**Objectifs :**

- Compréhension des facteurs développementaux et métaboliques impliqués dans l'acquisition de la capacité à accumuler des réserves par les graines au cours de leur développement et dans leur composition en utilisant le pois et deux plantes modèles : *Medicago truncatula* et *Arabidopsis thaliana*.
- Isolement et clonage des gènes importants impliqués dans les mécanismes étudiés.
- Isolement et caractérisation fonctionnelle de promoteurs permettant une expression des gènes dans la graine régulée spatialement et temporellement.
- Manipulation des gènes d'intérêt dans les plantes modèles.

**Equipes**

Intitulé des Unités	Dept		Statut et nombre de chercheurs /an *				
			1995	1996	1997	1998	1999
Laboratoire du Métabolisme et de la Nutrition des plantes	BV	INRA	2	2	2	2	2
		Thésards Post-doc CDD	1	1 1	1 1	1 1	
Laboratoire de Biologie des Semences	BV	INRA			1	1	1
		Thésards Post-doc CDD				1	2

**Contrats sur la période 1995-1999**

Equipe INRA contractante	Partenaires professionnels	Partenaires "recherche"	Origine du financement	Période
Lab. Métabolisme	UNIP	Lab. Agronomie et de Génétique Dijon	Contrats de recherche et thèses	1995-1998
Lab. Métabolisme	-	IPK-Gatersleben (D) et JIC-Norwich (GB)	UE	1996-1999
Lab. Métabolisme	-	LBTG, LPCM et UBTP Nantes, Lab. Agronomie et de Génétique Dijon	AIP	1997-1998
Laboratoire de Biologie des Semences	Génoplante	Consortium INRA-CNRS-privés	Génoplante	1999-2000

**Autres collaborations nationales et internationales sur le thème :**  
néant

### Résultats majeurs : (15-20 lignes)

- Le rôle du tégument dans le développement de la graine de pois a été précisé. Cet organe est le siège d'une intense activité métabolique et d'un stockage temporaire d'assimilats. Il assure le contrôle de l'environnement nutritionnel de l'embryon durant tout son développement.
- Le niveau de l'activité saccharose synthase (Sus) dans tous les organes de la graine (tégument puis embryon) constitue, comparé à celui des autres enzymes impliquées dans la synthèse de l'amidon, le meilleur marqueur de l'expression de la force de puits de la graine de pois.
- L'activité Sus résulte, dans le tégument et dans l'embryon de la graine, de l'expression de deux gènes. Le gène *Sus1* est exprimé surtout durant les 1ers stades de développement du tégument et de la maturation. Un second gène de Sus, *Sus2*, a été isolé et cloné dans le laboratoire, il est exprimé de façon notable tardivement au cours du développement du tégument et de l'embryon.
- La taille de la graine de pois est fortement contrôlée par un effet maternel qui joue à la fois sur le nombre et la taille des cellules cotylédonnaires. L'influence maternelle sur le nombre de cellules cotylédonnaires résulte de la modulation de l'activité mitotique durant la phase de division cellulaire dans l'embryon et non de la durée de cette phase. L'activité mitotique de l'embryon est fortement corrélée avec la concentration en hexoses du liquide dans lequel se développe l'embryon. Cette concentration en hexose est elle même reliée à l'activité invertase acide de tissus maternels de la graine.
- Un promoteur permettant une expression spécifique des gènes dans le tégument de la graine de pois a été isolé et est en cours de validation dans *Medicago trunculata*.
- Les températures élevées appliquées durant la maturation de la graine de pois influencent la quantité de réserves accumulées et certaines de leurs propriétés fonctionnelles.
- Isolement d'une centaine de mutants d'*Arabidopsis thaliana* affectés dans la maturation

### Travaux en cours (5lignes)

- Le rôle de *Sus2* dans le développement de la graine et la caractérisation d'un mutant déficient en activité *Sus1*.
- Caractérisation au niveau des métabolismes carbonés, lipidiques et azotés de mutants ridés d'*Arabidopsis*.
- Approfondissement du rôle des tissus maternels dans le développement de la graine de pois et d'*Arabidopsis*.
- Validation de promoteurs spécifiques du tégument dans *Arabidopsis*.
- Enrichissement de la collection de mutants affectés dans la maturation et criblage de la collection
- Caractérisation de certains de ces mutants

### Perspectives (5 lignes)

Le groupe du laboratoire du Métabolisme impliqué dans les recherches sur le développement de la graine va être affecté au laboratoire de Biologie des Semences au cours de 1999. En conséquence les travaux en cours, en particulier ceux de génétique moléculaire, seront surtout effectués en utilisant les plantes modèles, spécialement *A. thaliana*. L'objectif devient la caractérisation systématique au niveau génétique et biochimique, avec le Génoplante, des mutants de maturation (100) et le clonage des gènes impliqués.

### Situation de la Recherche : (5 -10 lignes)

**- au plan national** (mentionner si d'autres organismes que l'INRA s'impliquent dans ce domaine - CNRS, Université, structure privée)

Aucun laboratoire en France, autre que ceux avec lesquels nous collaborons, ne mène des études aussi étroitement reliées aux légumineuses à grosses graines que nous dans notre domaine. Par contre plusieurs laboratoires CNRS, universitaires et même privés mènent des études sur *A. thaliana* (ou d'autres plantes modèles) dont les résultats seront potentiellement applicables aux légumineuses très rapidement.

**- au plan Européen**

Pour les travaux intéressant directement la filière, deux instituts sont leader dans le domaine : le John Innes Centre de Norwich (GB) et de l'IPK-Gatersleben (DE) dans lesquels de nombreuses unités ont des programmes proches des nôtres (nous avons des collaborations avec certaines). Pour ce qui est des travaux de génétique moléculaire sur des plantes modèles, voir ci-dessus.

### - au plan mondial

Excepté en Australie où le CSIRO et des laboratoires universitaires ou privés mènent le même type d'étude que nous sur le pois et le lupin, le soja est la légumineuse la plus étudiée partout ailleurs dans le monde, spécialement aux USA. Pour ce qui est des travaux de génétique moléculaire sur des plantes modèles, voir ci-dessus.

### - Positionnement des équipes INRA dans le contexte international

L'association de généticiens moléculaires et de biochimistes constitue la structure la plus performante pour progresser dans le domaine de la mise en réserve et du développement de la graine. C'est la raison qui a amené le renforcement de l'équipe de Biologie des Semences. Les relations privilégiées que nous avons avec nos collègues technologues, agronomes et généticiens vont permettre des approches pluridisciplinaires des grands problèmes de la filière.

### Remarques Générales :

- Les équipes effectuant une recherche fondamentale dans le domaine de la maturation des graines sont encore trop peu développées en France, surtout si on fait une comparaison avec ce qui existe chez nos voisins Britanniques et Allemands (JIC et à l'IPK) et par rapport aux demandes de l'interprofession.
- Pour le type de recherche envisagé, la distinction entre plante protéagineuse et plante oléagineuse est plus gênante qu'utile. D'ailleurs, ces dernières n'assurent-elles pas une importante production de protéines? Enfin la principale plante modèle en génétique moléculaire (*Arabidopsis thaliana*) est une oléo-protéagineuse.

### Publications récentes (5-10)

- Rochat C., Wuillème S., Boutin J.P., Hedley C.L., 1995. A mutation at *rb* gene, lowering ADPGPPase activity, affects storage metabolism of pea seed coats. *J. Exp. Bot.*, 46, 415-421.
- Déjardin A., Rochat C., Maugenest S., Boutin J.P., 1996. Purification, characterization and physiological role of sucrose synthase in the pea seed coat (*Pisum sativum* L.). *Planta*, 201, 128-137.
- Déjardin A., Rochat C., Wuillème S., Boutin J.P., 1997. Contribution of sucrose synthase, ADP-glucose pyrophosphorylase and starch synthase to starch synthesis in developing pea seeds. *Plant Cell Environ.*, 20, 1421-1430.
- Buchner P., Boutin J-P., 1998. A MADS box transcription factor of the AP1/AGL9 subfamily is also expressed in seed coat of pea (*Pisum sativum*) during development. *Plant Mol. Biol.*, 38, 1253-1255.
- Buchner P., Poret M., Rochat C., 1998. Cloning and characterization of a cDNA (Accession no AJ001071) encoding a second sucrose synthase gene in pea (*Pisum sativum* L.) *Plant Physiol.*, 117, 179

## **Génétique et Amélioration des Plantes**

## INRA - Groupe Filière Protéagineux

### Inventaire des programmes de recherches pour la période 1995-1999

#### Intitulé du Programme de Recherche :

**AMELIORATION GENETIQUE DE LA COMPOSITION DE LA GRAINE DE POIS ; INCLUANT LES RELATIONS AVEC LA NUTRITION AZOTEE DE LA PLANTE**

#### Objectifs :

**Maîtriser génétiquement l'élaboration des réserves de la graine de pois et leur valeur nutritionnelle pour l'alimentation animale.**

**L'étude comporte les facettes suivantes :**

- ♦ Génétique (cartographie de QTL et gènes candidats) de la composition de la graine de pois, de sa fraction protéique et liaison avec sa valeur d'utilisation;
- ♦ Relation entre structure cellulaire, endoreduplication et qualité de la graine ;
- ♦ Régulation d'expression des gènes de protéines de réserve chez des espèces modèles (*Medicago truncatula*, *Arabidopsis*) et homologies avec le pois ;
- ♦ Efficience des voies de nutrition azotée de la plante et relation avec la qualité des réserves de la graine ;
- ♦ Elargissement de la variabilité génétique par hybridation interspécifique et transformation génétique ;
- ♦ Etude de l'organisation des génomes et cartographie comparée ;

Intitulé des Unités	Dept	Statut et nombre de chercheurs /an *					
			1995	1996	1997	1998	1999
Unité de génétique et A.P. (G. Duc, C. Mousset-Déclas 80%, J. Burstin, S. Ochatt, M. Sagan-congé parental, M. Darmency)	GAP	INRA DR-CR Thésards, Post-doc	6	6	6	6	6
IR, IE, AI,			2	2	1	2	3
TR, AJT, AGT			9	9	9	9	9

#### Contrats sur la période 1995-1999

Equipe contractante	INRA	Partenaires professionnels	Partenaires « recherche »	Origine du financement	Période
URGAP Dijon		GIE féverole	Sélectionneurs privés	UNIP	1995-1999
URGAP Dijon		UNIP- ULICE		CIFFRE	1996 - 1999
URGAP Dijon			INRA Nantes	AIP AGRICE	1996-1998
URGAP Dijon			INRA Nantes, Dijon, Versailles	AIP AGRAF	1997-1999
URGAP Dijon			INRA Nantes, Tours, Rennes, ENESAD	AIP ALIMAN	1997-1998

URGAP Dijon		ENESAD et INRA Dijon	Région Bourgogne	1997-1999
URGAP Dijon		AEP	UE-FAIR	1999-2001
URGAP	CTPS	ITCF, INRA Dijon	CTPS	1999-2001

### Autres collaborations nationales et internationales sur le thème :

#### Nos collaborations au niveau national concernant différents laboratoires de recherche :

- Groupes protéagineux INRA INRA-DGAP
- Chimistes et technologues (INRA Nantes)
- Physiologistes et agronomes du pois (INRA Versailles, INRA Mahebourg-Agronomie Dijon)
- Nutritionnistes animaux (INRA Rennes, ENSAIA Nancy)
- Laboratoire « qualité des produits végétaux » (ENESAD-Dijon)
- Génétique des symbioses et *Medicago truncatula* (INRA Toulouse et ISV-Gif sur Yvette)
- Les généticiens du protéome-plante (INRA – GIS Moulon)
- Groupe Biologie des semences (INRA –Versailles)
- Chaire de Physiologie Végétale (Fac Sci.-Univ Dijon)

Nos collaborations de niveau international majeures sont avec le John Innes Center (UK). Nous participons à l'Action Concertée Européenne LINK 1999-2001 sur les protéagineux, à l'Action COST 843 sur les biotechnologies et à une Action FAO sur hybridation somatique pois-lathyrus. Enfin nous avons développé une collaboration bilatérale avec l'Institut des Ressources Génétique de Beijing (Chine).

Nos collaborations avec la profession concernent le GEVES, l'interprofession (Union Nationale Interprofessionnelle des Protéagineux) et des groupes semenciers privés.

### Résultats majeurs : (15-20 lignes)

Travail mis en œuvre de façon récente (3 ans) dans le laboratoire pour les aspects qualité de la graine de pois. Le laboratoire a décrit le mode d'hérédité de différentes compositions en fractions protéiques chez le pois. Il a mis en évidence un polymorphisme moléculaire au niveau des gènes codant pour les inhibiteurs trypsiques qui paraît relié à des différences d'activité des inhibiteurs. Dans le cadre de l'AIP ALIMAN, les paramètres taille des cellules et importance des parois cotylédonnaires ont été évalués comme facteurs de la digestibilité. Dans le cadre de l'AIP AGRAP, les facteurs niveau de nutrition azotée et température sont apparus comme facteurs de variation de la composition protéique.

Les références du laboratoire en matière d'analyse de la fixation symbiotique de l'azote sont plus anciennes et ont donné des résultats nombreux. L'étude met en œuvre une variabilité génétique importante pour l'aptitude à la fixation incluant des mutants d'efficacité de la voie de fixation chez le pois et *M. truncatula*.

Une variabilité génotypique chez le pois portant sur le niveau d'endoreduplication en liaison avec le poids de la graine et la taille des cellules de la graine a été récemment mise en évidence, ainsi qu'un effet de la température. La régénération de plantes fertiles à partir d'explants et de protoplastes de pois est maîtrisée depuis peu, et la première fusion de protoplastes pois-Lathyrus a été récemment obtenue.

La technique d'hybridation *in situ* sur chromosomes de pois est fonctionnelle à partir de différentes sondes dont celles des gènes de légumine K, ce qui permet l'étiquetage des chromosomes et les premiers travaux de cartographie physique.

### Travaux en cours (5lignes)

Evaluation de la diversité d'une collection de ressources génétiques au niveau moléculaire et au niveau des caractères liés à la composition protéique de la graine.

Analyse génétique d'une collection de mutants de pois et *Medicago truncatula* à fixation de N<sub>2</sub> nitrate-tolérante ou à fixation persistante ; cartographie des mutations.

Etude comparée du mutant de pois 447 et de son parent Frisson pour l'endoreduplication et la structure cellulaire. Recherche de cyclines.

Recherche de marqueurs cytogénétiques et visualisation sur les chromosomes par hybridation *in situ* de gènes de fonction connue (exp : gènes de protéines de réserve).

Régénération à partir d'explants et de protoplastes de pois et *Lathyrus sativus* ; hybridation somatique par fusion de protoplastes de pois et de *L. sativus*.

Innovation variétale par l'introduction de gènes de symbiose et de composition de la graine dans des fonds génétiques d'intérêt agronomique ; accélération des cycles de sélection ;  
 Evaluation rapide de la composition de graine (NIRS, tests d'activité anti-trypsiques)

### **Perspectives (5 lignes)**

Cartographie de QTL de caractères liés à la valeur nutritionnelle de la graine de pois ;  
 Analyse de la régulation des gènes de protéines de réserves des graines d'une espèce modèle : *M. truncatula* ou *Arabidopsis* (recrutement CR 2000).  
 Analyse des relations entre variations d'activité symbiotique et variations de composition de la graine ; analyse de l'impact sur le développement racinaire ; homologues pois-*M.truncatula* .  
 Etude des relations entre composition biochimique de la graine et endoreduplication.  
 Intégration de la carte physique et génétique ; définition des groupes de synténie pois-*Medicago truncatula*, pois-*Arabidopsis thaliana*.  
 Développement et exploitation de la transgénèse chez le pois pour l'analyse de la régulation d'expression des gènes et l'amélioration de la qualité protéique de la graine.  
 Dans le cadre d'une action de sélection, validation de la SAM.

### **Situation de la Recherche : (5 -10 lignes)**

#### **- au plan national**

L'action sur la qualité de la graine de pois est essentiellement basée à l'INRA avec un fort partenariat des sélectionneurs privés avec qui se monte le projet Génoplante-pois. L'action met en jeu des collaborations avec d'autres Départements INRA. Une équipe à l'ENESAD s'intéresse à la valeur semencière et connecte son étude à la nôtre.

L'action sur l'efficacité de la nutrition azotée symbiotique est originale, n'est considérée ni à l'INRA de Toulouse ni au CNRS de GIF qui sont néanmoins des collaborateurs.

Ce programme offre des possibilités d'action transversales à différentes disciplines à l'INRA, dont certaines sont déjà en place.

#### **- au plan Européen**

Un programme européen a permis de lever le verrou de la transgénèse du pois, sans néanmoins déboucher sur une technique de routine et à haut rendement. Le pois est travaillé depuis longtemps au JIC-Norwich, avec un objectif de cartographie génétique, de génomique, de valorisation en alimentation humaine ou usages non-alimentaires.

L'action de ce groupe n'intègre pas une approche agronomique globale et ne cible pas les usages en alimentation animale. Nous avons des collaborations avec ces équipes.

L'action sur la nutrition azotée est originale et répond au double souci de bilan d'azote dans la plante et incidence sur la qualité

#### **- au plan mondial**

Les équipes Australiennes travaillent à la modification des profils en acides aminés du pois par transgénèse. Ils ont une évaluation agronomique des ressources génétiques et variétés étrangères en ce qui concerne les aspects productivité du pois.

#### **- Positionnement des équipes INRA dans le contexte international**

Le pois est avant tout un protéagineux français et les forces de recherche engagées par l'INRA sont significatives. Ce programme et ses sous-thèmes sont originaux à notre connaissance. Il offre des possibilités de collaborations avec l'étranger, le JIC-Norwich notamment.

### **Publications récentes (5-10)**

SAGAN M., DUC G., 1996. *Sym28* and *sym29*, two new genes involved in regulation of nodulation in pea (*Pisum sativum* L.). *Symbiosis*, 20, 229-245

DUC G., PAGE D., SAGAN M., VIROBEN G., GUEGUEN J., 1996. Effect of nitrogen nutrition pathways on the quality of nitrogen storage compounds in legumes. 2nd European Nitrogen Fixation Conference. A. Legocki, H. Bothe, A. Püller (Eds), NATO-Asi Series G38, Springer Verlag, vol. 39, p. 275-278.

Agronomie 17, 349-360. BOUTIN J.P., COLONNA P., DUC G., GUEGUEN J., MOUSSY F., ROCHAT C., ROUX Y., WUILLEVRE, 1998. Isolation and characterization of new wrinkled seeded mutants of pea. In 3rd European Conference on Grain Legumes, Valladolid, Spain, 14-19/09/98, AEP (Pbs), ISBN n° 2-9509491-2-6, p. 196-197.

HESS V., THIBAUT J.N., DUC G., MELCION J.P., VAN EYS J., SEVE B., 1998. Influence de la variété et du microbroyage sur la digestibilité iléale de l'azote et des acides aminés de pois. Digestibilité réelle de l'azote et pertes endogènes spécifiques. Journées Rech. Porcines en France, 3-4-5/2/98, Paris, 30, 223-229.

PAGE D., MOUSSY F. and DUC G., 1998. Heritability of pea seed protein quality : evaluation of maternal effects. 3rd European Conference on Grain Legumes, Valladolid, Spain, 14-19/09/98, AEP (Pbs), ISBN n° 2-9509491-2-6, p. 68-69.

DUC G., MARGET P., ESNAULT R., LE GUEN J., BASTIANELLI D., 1999. Genetic variability for feeding value of faba bean seeds (*Vicia faba* L.). Comparative chemical composition of isogenics involving zero-tannin and zero-vicine genes. Journal of Agricultural Science, 133, 185-196.

SCHNEIDER A., POYSER S., WALKER, S.A., SAGAN M., T.H.N. ELLIS, J.A. DOWNIE, 1999, Sym19 is linked to ENOD40 and acts upstream of ENOD12A in the nodulation of pea (*Pisum sativum* L.), MGG, 262, 1-11

BENABDELMOUNA A., PELTIER D., HUMBERT C., ABIRACHED-DARMENCY M., 1999. Southern and fluorescent *in situ* hybridization detect 3 RAPD-generated PCR products useful as introgression markers in *Petunia*. Theor. Appl. Genet. 98, 10-17

LEMONTEY, C., MOUSSET-DÉCLAS C., MUNIER-JOLAIN N., BOUTIN, J.P. 1999, Maternal genotype influences pea size by controlling mitotic activity during early embryogenesis and final endoreduplication level/cotyledon-cell size in mature seeds. J. Exp. Bot, 51, 343, 167-175

PAGE D., QUILLIEN L., DUC G., 1999. Trypsin inhibitory activity measurement : simplifications of the standard procedure used for pea seeds. Crop Science. in press

OCHATT S.J., PONTECAILLE C., RANCILLAC M., 2000. The growth regulators used for bud regeneration and shoot rooting affect the competence for flowering and seed set in regenerated plants of protein peas. In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant, 36 (2), in press

OCHATT S.J., MOUSSET-DECLAS C., RANCILLAC M., 2000. Fertile pea plants regenerate from protoplasts when calluses have not undergone endoreduplication. Plant Sci, in press

## INRA - Groupe Filière Protéagineux

### Inventaire des programmes de recherches pour la période 1995-1999

#### Intitulé du Programme de Recherche :

MODIFICATION DE L'ARCHITECTURE DE LA PLANTE CHEZ LE POIS.

#### Objectifs :( 5 lignes)

Obtenir et fixer chez le pois des mutants de développement afin d'accroître la ramification, trouver des types présentant une meilleure tenue à la verse. D'une manière plus générale, il s'agira de contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes de dominance apicale chez le pois.

#### Equipes

Intitulé des Unités	Dept	Statut et nombre de chercheurs /an *	Statut et nombre de chercheurs /an *				
			1995	1996	1997	1998	1999
Station de génétique de Versailles (C. Rameau, V. Laucou, )	GAP	INRA	2	2	2	2.5	2.5
		Thésards		1	1	1	
		Post-doc CDD					
		INRA					
		Thésards					
		Post-doc CDD					

#### Contrats sur la période 1995-1999

Equipe contractante	INRA	Partenaires professionnels	Partenaires « recherche »	Origine du financement	Période
Station Génétique		UNIP	GSP	UNIP	1995 - 99

#### Autres collaborations nationales et internationales sur le thème :

Génoplande  
 Laboratoire ressources génétique pois INRA  
 Laboratoire transformation génétique  
 Réseau DGAP  
 GSP

#### Résultats majeurs : (15-20 lignes)

Les premiers travaux de mutagenèse sur le cultivar Tèreze ont permis de retrouver 3 des gènes ramosus connus (gènes rms) et de trouver 2 nouveaux gènes de ce type. Par ailleurs, une carte génétique du pois a été réalisée et comporte 250 marqueurs RAPD répartis en 9 groupes de liaison. 10 mutations, le plus souvent localisées sur la carte de marqueurs classiques ont pu être cartographiées par rapport à ces marqueurs RAPD. Il s'agit de 2 gènes

de floraison (sn et dne), 5 gènes de ramification (ramosus), un gène de nanisme et les gènes de croissance déterminée (det) et de faciation de la tige (fa).

### Travaux en cours (5lignes)

L'intégration précise de cette carte avec celle de Noel Ellis (John Innes Institute) se fait par l'intermédiaire de 7 marqueurs RFLP, 26 marqueurs RAPD et 1 marqueur PCR. L'intégration des 2 cartes a permis de mettre en évidence une co-localisation du gène Kn28 et de la mutation rms3 sur le groupe de liaison II.

### Perspectives (5 lignes)

Recherche chez le pois d'homologues de gènes. Recherche d'une stratégie d'extraction de gènes par PCR en partant du principe qu'un certain nombre de gènes clonés chez *Arabidopsis* présentent un intérêt dans la mesure où ils sont candidats pour correspondre à l'une ou l'autre des mutations (gènes cki1, famille psiaa4/5-like, gènes type aux1, gène anr1)

Recherche de gènes exprimés spécifiquement dans les racines du mutant rms4 ou du sauvage par DDRT-PCR.

Analyse de la variabilité génétique à l'aide de marqueurs moléculaires

Génomique lourde sur *Arabidopsis* et sur *Medicago truncatula*.

### Situation de la Recherche : (5 -10 lignes)

- **au plan national** (mentionner si d'autres organismes que l'INRA s'implique dans ce domaine - CNRS, Université, structure privée)

Il est difficile dans ce secteur de connaître le niveau de la recherche dans le privé. Il est certain que les grands groupes ont un fort investissement dans ce domaine (LIMAGRAIN, RHONE POULENC, ...).

Génoplante lance un projet, auquel l'INRA est associé, dans ce domaine (Biogemma, bioplante, ...).

Le secteur semencier « traditionnel » a pour le moment peu développé des recherches dans ce secteur.

- **au plan Européen**

**Le John Innes Institute de Norwich développe des recherches de cartographie RFLP du pois.**

L'Université de Hanovre et celle de Berlin ont également développé une activité davantage portée sur les problèmes de transgénèse dans le cadre d'un projet européen (Transleg) auquel participe l'INRA (équipe E. Teoulé / Grégoire).

Le laboratoire de l'Université de Tübingen (Laboratoire de T. Schmülling) sur les problèmes de transformation.

- **au plan mondial**

**En Nouvelle Zélande, l'Université de Hobart en Tasmanie (laboratoire de Murfet) et l'Université de Brisbane en Australie travaillent à la caractérisation physiologique des mutants rms.**

- **Positionnement des équipes INRA dans le contexte international**

Les équipes INRA ont eu un peu de mal à se positionner et ont encore quelques hésitations sur le choix définitif des thèmes à développer. Leur effectif trop faible pose le problème du choix entre génomique générique (*Arabidopsis* et *Medicago*) et la génomique des espèces d'intérêt (pois), une activité forte sur les deux approches n'étant pas possible.

### Remarques Générales :

L'approche moléculaire est absolument indispensable au développement des stratégies de sélection du pois. L'approche gènes candidats ou RGA sera développée. La carte moléculaire, après intégration avec la carte RFLP de N. Ellis, devra être complétée. L'entrée de l'équipe dans un club « microsattellites » est en cours.

### Publications récentes (5-10)

Weller, J.L., Terry, M.J., Rameau, C., Reid, J.B., Kendrick, R.E. (1996) The phytochrome-deficient *pcd1* mutant of pea is unable to convert heme to biliverdin IXa. *Plant Cell* 8, 55-67.

Beveridge, C.A., Murfet, I.C., Kerhoas, L., Sotta, B., Miginiac, E., Rameau, C. (1997) The shoot controls zeatin riboside export from pea roots. Evidence from the branching mutant *rms4*. *The Plant Journal* 11:339-345.

- Chalhoub, B.A., Thibault, S., Laucou, V., Rameau, C., Höfte, H., Cousin, R. (1997) Silver staining and recovery of AFLP™ amplification products on large denaturing polyacrylamide gels. *Biotechniques* 22, 2, 216-220.
- Beveridge, C.A., Symons G.M., Murfet, I.C., Ross J.J., Rameau, C. (1997) The *rms1* mutant of pea has elevated of indole-3-acetic acid levels and reduced root-sap zeatin riboside content but increased branching controlled by graft transmissible signal(s). *Plant Physiol* 115: 1251-1258.
- Rameau, C., Bodelin, C., Cadier, D., Grandjean, O., Miard, F., Murfet, I.C., 1997. New *ramosus* mutants at loci *Rms1*, *Rms3* and *Rms4* resulting from the mutation breeding program at Versailles. *Pisum Genetics* 29
- Laucou, V., Haurogné, K., Ellis N., Rameau, C. Genetic mapping in pea. 1- RAPD-based genetic linkage map of *Pisum sativum*. 1998 *Theor Appl Genet* 97:905-915 .
- Rameau, C., Dénoue, D., Fraval, F., Haurogné, K., Josserand, J., Laucou, V., Batge, S., Murfet, I.C. Genetic mapping in pea. 2- Identification of RAPD and SCAR markers linked to genes affecting plant architecture. 1998 *Theor Appl Genet* 97:916-928.

## INRA - Groupe Filière Protéagineux

### Inventaire des programmes de recherches pour la période 1995-1999

#### Intitulé du Programme de Recherche :

#### RESISTANCE AU GEL CHEZ LE POIS

#### Objectifs :( 5 lignes)

Rechercher les moyens de créer des pois résistants à l'hiver afin que l'accroissement de précocité résultant de la culture de tel génotype de pois puisse échapper aux stress hydrique de fin de cycle. Cet objectif répond à 2 problématiques, l'une étant de déterminer les conditions de maintien à l'état végétatif des plantes pendant la phase hivernale, l'autre étant de mettre en évidence et d'utiliser une éventuelle variabilité génétique pour la résistance au froid.

#### Equipes

Intitulé des Unités	Dept		Statut et nombre de chercheurs /an *				
			1995	1996	1997	1998	1999
Station de génétique et d'amélioration des plantes de Mons – Péronne.	GAP	INRA	3	3	3	3.5	3.5
		Thésards					
		Post-doc					
		CDD					
		INRA					
		Thésards					
		Post-doc					
		CDD					
		INRA					
		Thésards					
		Post-doc					
		CDD					

#### Contrats sur la période 1995-1999

Equipe INRA contractante	Partenaires professionnels	Partenaires « recherche »	Origine du financement	Période
SGAP Mons	UNIP	GSP	UNIP	1995 - 99

#### Autres collaborations nationales et internationales sur le thème :

Réseau protéagineux DGAP  
 Génoplante  
 Université de Lille  
 Région Picardie  
 Sélectionneurs privés – GSP  
 Agronomie, Ecophysiologie, physiologie INRA  
 Université de Tasmanie (laboratoire Murfet)  
 INIA Madrid (laboratoire Julio Salinas)

### Résultats majeurs : (15-20 lignes)

En ce qui concerne le maintien à l'état végétatif des plantes, la mise en évidence d'un gène majeur de sensibilité à la photopériode a été réalisée. Afin de trouver un marqueur moléculaire associé à ce gène, des lignées recombinantes ont été créées et seront analysées en 1999.

En ce qui concerne la résistance au gel, celle-ci dépend de la capacité des plantes à s'endurcir. Dans une première approche, en relation avec la SAP de Versailles, la variabilité génétique des besoins en températures d'endurcissement a été étudiée. Dans le même temps, en relation avec le laboratoire d'agronomie de Dijon, une étude des modifications cellulaires en réponse à une résistance au gel est en cours.

### Travaux en cours (5lignes)

Cf. ci dessus, dans la mesure où il y a continuité des manipulations dans ce domaine. Une priorité sera donnée aux études relatives à la recherche de résistances au gel.

### Perspectives (5 lignes)

Mise en évidence et cartographie de gènes de résistance au gel selon 4 approches.

- ◆ Recherche chez le pois de gènes homologues à des gènes d'Arabidopsis induits par les basses températures (collaboration INIA Madrid)
- ◆ Criblage d'une banque d'EST dans le cadre de Génoplante
- ◆ Etude de l'expression protéique différentielle lors de l'acclimatation au froid (collaboration Université de Lille)
- ◆ Cartographie de gènes d'intérêt, de QTLs et de PQLs dans les lignées recombinantes.

### Situation de la Recherche : (5 -10 lignes)

**- au plan national** (mentionner si d'autres organismes que l'INRA s'implique dans ce domaine - CNRS, Université, structure privée)

Génoplante (Biogemma, bioplante, Nickerson, Sofiprotéol,...)

Université de Lille

Réseau DGAP

Sélectionneurs privés (GSP)

**- au plan Européen**

INIA Madrid

John Innes Institute

**- au plan mondial**

Université de Tasmanie

**- Positionnement des équipes INRA dans le contexte international**

L'INRA, après une période nécessaire de positionnement, occupe aujourd'hui une position forte sur ces thématiques et a su établir des collaborations nationales et internationales de très bon niveau. Les objectifs ont été clairement définis et la démarche est originale et ambitieuse.

### Remarques Générales :

La sélection de matériel résistant au froid est un élément fondamental dans la perspective de créer un type d'hiver chez le pois. De cette possibilité dépend le développement de la culture dans des zones actuellement proscrites en raison de déficit hygrométriques sévères. Par ailleurs, l'amélioration du niveau et de la stabilité des rendements du pois dépendent en partie de la possibilité qu'il y aura à sélectionner des variétés d'hiver.

### Publications récentes (5-10)

- LEJEUNE-HENAUT I., FOUILLOUX G., AMBROSE M.J., DUMOULIN V., ETEVE G., 1992 : Analysis of a 5 parents half diallel on dried pea (*Pisum sativum* L.) : 1. Seed yield heterosis. *Agronomie*, 12 : 545-550.
- BIARNES-DUMOULIN V., DENIS J.B., LEJEUNE-HENAUT I., ETEVE G., 1996 : Interpreting yield instability in pea using genotypic and environmental covariates. *Crop Sci.*, 36 : 115-120.
- LEJEUNE-HENAUT I., BOURION V., ETEVE G., CUNOT E., DELHAYE K., DESMYTER C., 1999 : Floral initiation in field-grown forage peas is delayed to a greater extent by short photoperiods, than in other types of european varieties. *Euphytica* (à paraître)
- LEJEUNE-HENAUT I., WERY J., 1994 : Influence du froid sur la survie des plantes. In *Agrophysiologie du pois protéagineux. Applications à la production agricole*. UNIP, ITCF, INRA éd., 280 p : 139-144 (texte intégral).
- LEJEUNE-HENAUT I., MUEHLBAUER F.J., 1996 : Resistance to frost for winter grain legumes. *Grain legumes*, 16 : 18-19.
- LEJEUNE-HENAUT I., 1996 : La génétique de la résistance au gel, interactions avec le développement et l'architecture de la plante. In *Forum Pois 96, Améliorer le rendement du pois protéagineux et maintenir une qualité élevée*. UNIP, ITCF, INRA éd., 35p : 10-11 (résumé).
- LEJEUNE-HENAUT I., 1996 : Abiotic constraints on yield and produce quality. In *Problems and prospects for winter sowing of grain legumes in Europe*. AEP éd., 119 p : 73-75 (résumé).
- LEJEUNE-HENAUT I., ALBARET P., BURGHOFFER A., MORIN G., MOUSSY F., DUPARQUE M., 1997 : Ressources génétiques du pois en France : gestion physique et caractérisation. In *Ressources génétiques. Méthodologies de gestion et de conservation*. BRG, USTL éd., 76 p : 53-54 (poster).
- LEJEUNE-HENAUT I., BOURION V., ETEVE G., DEVAUX R., 1998 : Floral initiation of field-grown peas : photoperiod response of forage lines and european varieties. In *Opportunities for high quality, healthy and added-value crops to meet european demands*. 3rd European Conference on Grain Legumes. AEP éd. (poster).
- BOURION V., DUPARQUE M., MUNIER-JOLAIN N. and LEJEUNE-HENAUT I., 1998 : Variabilité génétique des rythmes de développement chez le pois. In *Opportunities for high quality, healthy and added-value crops to meet european demands*. 3rd European Conference on Grain Legumes. AEP éd., 513 p : 192-193 (poster).

## INRA - Groupe Filière Protéagineux

### Inventaire des programmes de recherches pour la période 1995-1999

#### Intitulé du Programme de Recherche :

**AMELIORATION GENETIQUE DU POIS A L'ANTHRACNOSE (*MYCOSPHAERELLA PINODES*).  
RECHERCHE DE RESISTANCES DURABLES.**

#### Objectifs :( 5 lignes)

Evaluer la variabilité génétique existante

Analyser le déterminisme génétique des résistances

Détermination de marqueurs moléculaires associés aux résistances (marqueurs simples et QTLs)

#### Equipes

Intitulé des Unités	Dept		Statut et nombre de chercheurs /an *				
			1995	1996	1997	1998	1999
Station d'amélioration des plantes (A. Baranger, J. Le Guen, R. Esnault, G. Morin)	GAP	INRA Thésards Post-doc CDD	2	2	2	2 1	2 1
		INRA Thésards Post-doc CDD					
		INRA Thésards Post-doc CDD					

#### Contrats sur la période 1995-1999

Equipe INRA contractante	Partenaires professionnels	Partenaires « recherche »	Origine du financement	Période
SAP - Le Rheu	UNIP	GSP		1995 - 1999

#### Autres collaborations nationales et internationales sur le thème :

Equipe SPE Rennes, Projet FRYMED, Génoplante (en négociation), partenaires semenciers privés, Réseau GAP (pour les aspects moléculaires)

#### Résultats majeurs : (15-20 lignes)

Etablissement d'une échelle de notation

Mise en évidence de résistances partielles et d'une variabilité génétique pour ces caractères.

Mise en place de schémas de croisements diallèles afin de déterminer les composantes génétiques de ces résistances (thèse en cours)

Mise en place de schémas de croisements pyramidaux pour associer les résistances génétiques  
Début d'approche moléculaire pour la caractérisation moléculaire des génotypes (préparation de lignées recombinantes)

### Travaux en cours (5 lignes)

Les travaux en cours concernent essentiellement la poursuite de ce qui a été décrit plus haut et en particulier la poursuite de l'analyse des croisements engagés. Parallèlement, l'aspect analyses biomoléculaires va être développé (recrutement d'un TR sur un profil biomoléculaire)

### Perspectives (5 lignes)

Les travaux de caractérisation des résistances partielles chez le pois à *M. pinodes* devraient permettre d'associer celles ci dans un génotype présentant un niveau satisfaisant de résistance au parasite. Par ailleurs, le laboratoire devrait accueillir dès l'an prochain un nouveau scientifique qui sera en charge des aspects *Aphanomyces* et bactériose.

Par ailleurs la localisation de ces caractères sur la carte génétique du pois est l'un des objectifs de ces recherches ainsi que la co-localisation de RGA (resistance genetics analogs)

### Situation de la Recherche : (5 -10 lignes)

**- au plan national** (mentionner si d'autres organismes que l'INRA s'implique dans ce domaine - CNRS, Université, structure privée)

Au plan national, le projet est essentiellement porté, en dehors de l'INRA, par l'Interprofession (UNIP) et les sélectionneurs privés (GSP).

**- au plan Européen**

Peu de travaux sur le sujet de l'antracnose en Europe. Le John Innes Institute de Norwich travaille à l'établissement d'une carte génétique pois.

**- au plan mondial**

Bonne équipe aux USA sur les maladies du pois (équipe de J. Kraft). Des travaux sont également en cours au Canada et en Australie. Peu d'information sur l'état de la recherche dans les PECO qui ont été pendant longtemps les premiers producteurs mondiaux de pois.

**- Positionnement des équipes INRA dans le contexte international**

Le positionnement par rapport à ce qui se fait dans le monde est certainement très bon. Les principaux « concurrents » scientifiques sont les américains et les canadiens, mais les équipes INRA ont la chance de pouvoir associer sur une même thématiques les compétences de chercheurs du Département SPE et du Département GAP. Par ailleurs, l'INRA possède des Ressources génétiques importantes et de bonne valeur.

### Remarques Générales :

Les recherches relatives aux résistances sont très certainement l'un des éléments fondamentaux du développement du pois protéagineux en France. C'est surtout la condition indispensable au développement du pois d'hiver. L'accent devra cependant être mis sur les aspects cartographie et recherche de gènes candidats et de RGA.

**Publications récentes (5-10)**

**Baranger A** (1998) Genetic resistance to fungi in pea. Sixth Transleg Workshop. 12-14 January, CNRA Versailles, France. Communication orale.

**Baranger A** (1998) Aide à la sélection : les nouveaux outils. Journée Atout Pois, 2 Avril 1998, Paris. Communication orale.

**Baranger A, Tivoli B, Onfroy C, Morin G, Le Guen J** (1997) Estimation of variation for resistance to *Mycosphaerella pinodes* in field-grown pea lines. Third International Food Legume Research Conference. September 1997, Adelaide, Australia. Poster et résumé, p 169.

**Baranger A, Tivoli B** (1998) Involvement of partial resistance in the genetic control of diseases - The case of *Ascochyta* blight resistance in peas. Proceedings of the Third European Conference on Grain Legumes, 14-19 November, Valladolid, Spain, p 107-113. Introductory talk.

## **Santé des Plantes et Environnement**

## INRA - Groupe Filière Protéagineux

### Inventaire des programmes de recherches pour la période 1995-1999

#### Intitulé du Programme de Recherche :

**ETIOLOGIE, CARACTERISATION DES POPULATIONS DE BIOAGRESSEURS**

#### Objectifs :( 5 lignes)

1 Identifier et caractériser les populations d'agents pathogènes en précisant leur nuisibilité, leur biologie et leur variabilité, avec des prolongements éventuels dans le domaine de la taxonomie

2 Améliorer, au besoin créer, les outils de détection de façon à les rendre hautement sensibles, spécifiques, fiables et utilisables à grande échelle

#### Equipes

Intitulé des Unités	Dept	Statut et nombre de chercheurs /an *	1995-1999				
			1995	1996	1997	1998	1999
Station de Pathologie végétale (Virologie), Versailles (Y. Maury, JM. Boissennec*)		INRA Thésards Post-doc CDI* (UNIP)		1  1	1  1	1  1	1  1
Station de Zoologie, Lusignan (R. Bournoville)		INRA Thésards Post-doc CDD	1	1	1	1	1
		INRA Thésards Post-doc CDD					

#### Contrats sur la période 1995-1999

Equipe contractante	INRA	Partenaires professionnels	Partenaires « recherche »	Origine du financement	Période
Virologie, Versailles		UNIP, AMSOL, ITCF		INRA, UNIP	1995-1999

#### Autres collaborations nationales et internationales sur le thème :

#### Résultats majeurs : (15-20 lignes)

En ce qui concerne les pucerons, dans le cadre de travaux sur la variabilité des populations du puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* sur la luzerne, et avec la collaboration de JC Simon du Rheu, des marqueurs (allozymes) ont été trouvés. Ils ont été appliqués par S.Carré (AI à Lusignan) en 1998 sur des populations de ce puceron se trouvant sur des légumineuses pérennes (dont la luzerne) et sur des légumineuses annuelles (dont le pois et la féverole) afin d'estimer l'homogénéité de ces populations. Des différences très marquées ont été trouvées notamment entre des populations **sympatriques** de la luzerne et du pois en conditions agronomiques. Les

analyses complémentaires réalisées par JC Simon sur ces échantillons ont confirmé ces distinctions avec des marqueurs microsatellites. Le modèle *A. pisum* est donc particulièrement intéressant pour l'étude des races d'hôtes des aphides.

**En ce qui concerne les virus**, les résultats significatifs concernent principalement :

- 1- Enquête nationale sur les virus dans les cultures de pois protéagineux  
Deux virus prédominants
  - pea enation mosaic virus
  - pea seed borne mosaic virus
- 2- Nuisibilité des deux principaux virus affectant les cultures de pois protéagineux.
- 3- Pea seed borne mosaic virus : simplification d'un test sur semences, virulence du pea seed borne mosaic virus par rapport aux sources de résistance identifiées chez *Pisum sativum*.
- 4- Pea enation mosaic virus : étiologie des jaunisses liées à la mosaïque énation du pois (recherche en cours)

### Travaux en cours (5lignes)

(voir la suite)

### Perspectives (5 lignes)

**En ce qui concerne les Pucerons**, le projet qui se développe va concerner Lusignan (analyses de terrain, caractérisation et identification de lignées avec les allozymes), étude des performances biologiques sur divers hôtes), l'Unité de Rennes (autres marqueurs et diversité génétique des relations entre races d'hôtes), et l'unité Insa-Inra à Villeurbanne du département SPEqui pourrait s'intéresser au métabolisme azoté des diverses races d'hôtes et aux aspects physiologiques de la spécialisation alimentaire. Cette unité a parmi ses modèles biologiques le puceron du pois.

#### En virologie :

##### - sur le pea seed borne mosaic virus

- transmission par la graine et évolution de cette propriété du virus après rupture de la pression de sélection ;
- incidence génétique de la multiplication dans le pois de certaines souches de ce virus.
- synergie entre ce virus et le pea énation mosaic virus

*Conséquences pratiques* :-obtention d'anticorps monoclonaux (Mab) contre l'ensemble des souches virales, pour définir dans le cadre de la standardisation effectuée par l'ISTA le cocktail de Mabs utilisable pour les échanges internationaux de semences de pois et de lentille.

##### - sur le pea enation mosaic virus

- variabilité dans l'assistance entre umbravirus et luteovirus impliqués dans le syndrome 'mosaïque énation'
- déterminants du symptôme d'énation (l'énation apparaît comme une différenciation suivie d'une gamme de redifférenciations, au niveau des nervures de la feuille ou de la gousse)

*Conséquences pratiques* :-résistance du pois à ce virus, comme suite de l'étude étiologique en cours

### Situation de la Recherche : (5 -10 lignes)

- **au plan national** (mentionner si d'autres organismes que l'INRA s'implique dans ce domaine - CNRS, Université, structure privée)

Tant pour les pucerons, que les virus, les thématiques étudiées se rattachent à des projets de recherche importants, développés par le Département SPE.

##### - au plan Européen

Sur les virus (fève, pois) : UK, Danemark, Espagne, Allemagne

##### - au plan mondial

Sur les virus ( fève, pois, lentille) : ICARDA (Syrie), Japon, USA

##### - Positionnement des équipes INRA dans le contexte international

## Remarques Générales :

Incertitudes concernant la pérennité des recherches en virologie liées au départ à la retraite de Y. Maury (prévu en 2000 ou 2001).

Cette thématique présente un intérêt stratégique pour la mise au point de méthodes de diagnostic, tant en ce qui concerne celui lié aux connaissances des populations de bioagresseurs, que celui lié à la détection des virus dans les graines et dans les plantes.

*Question : études de la vexion des virus par les pucerons (et conséquences épidémiologiques) à développer?*

## Publications récentes (5-10)

Françoise Leclercq-Le Quilic, Aymeric Pasquier, Bernadette Faivre, Olivier David, Yves Maury (1998). Prevalence of viruses of field pea in France. Third European Conference on Grain Legumes, (Valladolid, 14-19 Nov 1998) Proceedings p 98-99.

Masmoudi K., Suhas M., Khetarpal R.K., Maury Y. (1994). Specific serological detection of the transmissible virus in pea seed infected by pea seed borne mosaic virus. *Phytopathology* 84, 756-760.

Masmoudi K., Duby C., Suhas M., Guo J.Q., Guyot L., Olivier V. Taylor J., Maury Y. (1994). Quality control of pea seed for pea seed borne mosaic virus. *Seed Science and Technology*, 22, 407-414.

*(La liste concernant les pucerons est à établir)*

## INRA - Groupe Filière Protéagineux

### Inventaire des programmes de recherches pour la période 1995-1999

#### Intitulé du Programme de Recherche :

#### GESTION DES RESISTANCES ET POPULATIONS D'AGENTS PATHOGENES

#### Objectifs :( 5 lignes)

- Décrire et analyser la biologie et la génétique des populations d'agents pathogènes modèles
- Améliorer la méthodologie d'identification et de caractérisation des sources de résistance et des génotypes
- Evaluer la durabilité des résistances en relation avec la stratégie de gestion mise en œuvre

#### Equipes

Intitulé des Unités	Dept		Statut et nombre de chercheurs /an *				
			1995	1996	1997	1998	1999
Station de Zoologie (Nématologie), Rennes (G. Caubel, M. Esquibet, F. Abbad*)	SPE	INRA Thésards* Post-doc CDD	2	2 1	2 1	2 1	2 1
Station de Pathologie végétale (bactériologie et virologie), Versailles (J. Schmit, Y. Maury, JM. Bossennec*)	SPE	INRA Thésards Post-doc CDI*(UNIP)	2	2 1	2 1	2 1	Fin de Programme pour la bactériolo gie
Station de Pathologie végétale, Rennes (F. Rouxel, B. Tivoli, C. Onfroy*, E. Wicker*, A. Moussart*)	SPE	INRA Thésards Post-doc CDI* (UNIP)	1 1	2 1	2 2	2 3	2 3

#### Contrats sur la période 1995-1999

Equipe INRA contractante	Partenaires professionnels	Partenaires « recherche »	Origine du financement	Période
Toutes équipes	UNIP, GSP	UE		1995-1999

#### Autres collaborations nationales et internationales sur le thème :

Equipe du GAP, Rennes; équipes des instituts de recherche des pays d'Afrique du Nord (coopérations bilatérale et multilatérale)

#### Résultats majeurs : (15-20 lignes)

Les résultats concernent des modèles d'étude assez différents les uns des autres et le choix du modèle relève souvent davantage d'une demande professionnelle, ou d'une demande internationale que d'une véritable demande scientifique.

Les études visent d'une part, à caractériser les populations de bioagresseurs principalement au niveau de leur pouvoir pathogène et d'autre part, à déterminer les sources de résistance ainsi que les types de résistance observée.

**En ce qui concerne la bactériose (*Pseudomonas syringae* pv *psii*)**, les études ont permis de dresser un inventaire des races présentes en France (présence essentiellement de la race 2), d'étudier la relation entre distribution des races observée et résistances présentes, et de réaliser une caractérisation moléculaire des races par amplification des gènes d'avitulence. Par ailleurs, il a été fait une première mise en évidence d'une résistance à la race 6 (collaboration J.D.Taylor HRI Wellesbourne, R. Cousin INRA Génétique et Amélioration des Plantes, Versailles, dans le cadre d'un programme européen) dans l'espèce ancestrale *Pisum abyssinicum*. Enfin, l'analyse génétique de cette résistance et des autres résistances présentes chez le pois (collaboration R. Cousin INRA Versailles) a pu être entreprise : à côté de résistances dominantes déjà connues et présentes dans des cultivars commerciaux, d'autres résistances, notamment à la race 4, ont été identifiées chez *Pisum abyssinicum* où elles sont cumulées avec la résistance monogénique récessive à la race 6. Introduction de la résistance à la race 6 dans des cultivars de pois protéagineux de valeur agronomique (collaboration R. Cousin INRA Versailles).

**En ce qui concerne le nématode des tiges (*Ditylenchus dipsaci*)**, les principaux résultats concernent :

- caractérisation des races normales et géantes (RAPD),
- répartition géographique en parcelles et dans les semences (lots de semences),
- variabilité des souches, incompatibilité entre race normale et race géante,
- critères d'estimation de la résistance et mise au point de tests adaptés,
- appui à la création variétale,
- rôle de la semence et des pailles, analyses de détection,
- *Vicia sativa* en jachère : résultats non publiés (contrat privé).

**En ce qui concerne *Aphanomyces euteiches***, deux résultats majeurs sont à noter :

- Les populations européennes (Suède et surtout France) d'*A. euteiches* testées sont très agressives sur pois, comparées à des populations nord-américaines. Certains isolats sont très polyphages (pois, luzerne, vesce, féverole, haricot), tandis que d'autres semblent inféodés au pois. On note des différences importantes de niveaux d'agressivité entre isolats français, mais peu de différences de virulence, sur la base des hôtes différentiels utilisés jusqu'ici.
- Un test d'évaluation en conditions contrôlées du comportement variétal du pois vis-à-vis d'*A. euteiches* a été mis au point et est en cours de validation chez les sélectionneurs. Aucun des génotypes de pois considérés comme résistants aux USA ne donne satisfaction en France.

**En ce qui concerne *Mycosphaerella pinodes***, l'étude de 50 souches françaises montre une faible variabilité, tant en ce qui concerne les critères physiologiques, pathogéniques, que moléculaires. Il a été mis en évidence des génotypes primitifs présentant des niveaux intéressants de résistance partielle.

### Travaux en cours (5 lignes)

Les travaux en cours concernent principalement *A. euteiches*, *M. pinodes* et le nématode des tiges. Ils visent à approfondir les caractéristiques des populations, à mettre en évidence les composantes de la résistance partielle et à faire le point sur les tests d'appréciation du comportement variétal.

Ils sont réalisés en étroite collaboration avec les collègues du DGAP (A. Baranger, J. Le Guen) et les résultats obtenus sont transférés dans les équipes du département de GAP.

### Perspectives (5 lignes)

A terme, ces études doivent conduire à une meilleure utilisation et gestion des résistances au niveau d'une part, de la création variétale et d'autre part, de l'utilisation des variétés créées.

### Situation de la Recherche : (5 -10 lignes)

- **au plan national** (mentionner si d'autres organismes que l'INRA s'implique dans ce domaine - CNRS, Université, structure privée)

Ces programmes sont soutenus par les structures privées de sélection, réunies en Groupement de Sélectionneurs (GSP, qui réunit 7 sélectionneurs privés), sous l'impulsion de l'UNIP.

- **au plan Européen**

Peu d'équipes travaillent ces aspects en Europe; à noter une équipe au Danemark et une autre en Suède sur les maladies racinaires.

En ce qui concerne la bactériose, l'équipe anglaise de J. Taylor est tout à fait compétitive.

- **au plan mondial**

Dans le domaine des maladies racinaires, les équipes actuellement fonctionnelles sont situées aux USA (J. Kraft); pour l'antracnose du pois, elles se situent au Canada et en Australie.

### - Positionnement des équipes INRA dans le contexte international

En ce qui concerne le pois, les équipes INRA sont en concurrence avec certaines équipes des USA et d'Australie. Il faut bien noter que dans ce domaine, nos équipes sont beaucoup mieux structurées que celles des autres pays mentionnés.

Pour les autres légumineuses à grosses graines (notamment féverole et pois chiche), notre Institut a soit perdu ses compétences (féverole), soit ne les a jamais eues (pois-chiche). Les équipes espagnoles, indiennes, ou les Centres Internationaux de Recherche (ICARDA, ICRISAT), possèdent des structures et du matériel tout à fait compétitives.

### Remarques Générales :

Cette thématique est incontournable pour l'ensemble du département SPE; c'est ce qui explique le nombre des modèles étudiés (on peut même s'étonner qu'il n'y en ait pas plus).

Fin du projet bactériologie de Versailles (J. Schmit travaillant sur un autre sujet depuis fin 1998); quelle pérennité du programme virologie, après le départ à la retraite de Y. Maury (en 2000 ou 2001)?

Ces programmes nécessitent une forte interaction entre les départements SPE et GAP.

### Publications récentes (5-10)

CAUBEL G., ABBAD ANDALOUSSI F., BEKAL S., DI VITO M., ESQUIBET M., 1998. Les nématodes des Légumineuses alimentaires à grosses graines dans le Bassin méditerranéen. 2<sup>ème</sup> Séminaire GRAM Légumineuses alimentaires méditerranéennes, Rennes-Le Rheu, 20-23 février 1997. Les colloques, INRA Ed. Paris N°88 : 129-151.

ESQUIBET M., BEKAL S., CASTAGNONE-SERENO P., GAUTHIER J.P., RIVOAL R., CAUBEL G., 1998. Differentiation of normal and giant *Vicia faba* populations of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*: agreement between RAPD and phenotypic characteristics. *Heredity*, 81 : 291- 298.

KRAFT J.M., WICKER E., ROUXEL F., 1998. Breeding and selection of peas for aphanomyces root rot resistance. Third European Conference on Grain Legumes, (Valladolid, 14-19 Nov 1998) Proceedings p 114-115.

NASSAR A., SCHMIT J., BERTHEAU Y., ROUSSEAU M.T., NARCY J.P., ROUX J., LEMATTRE M. Discrimination des races de *Pseudomonas syringae* pv *pisi* par amplification simultanée de deux gènes *avr* et d'une séquence spécifique d'un sous-groupe du pathovar *pisi*. Troisièmes Rencontres de Phytobactériologie. Aussois, France, 11-15 janvier 1998. (INRA-CNRS, Toulouse éd.).

ONFROY C., B. TIVOLI, R. CORBIERE, Z. BOUZNAD, 1999 - Cultural, pathogenic and molecular variability of *Mycosphaerella pinodes* and *Phoma medicaginis* var *pinodella* isolates from dry pea in France. Plant pathol., (sous presse).

## INRA - Groupe Filière Protéagineux

### Inventaire des programmes de recherches pour la période 1995-1999

#### Intitulé du Programme de Recherche :

**ÉPIDEMIOLOGIE ET NUISIBILITE DES BIOAGRESSEURS SUR LE POIS PROTEAGINEUX**

#### Objectifs :( 5 lignes)

Acquérir des éléments analytiques du développement des maladies et des épizooties, et du fonctionnement des plantes sous contrainte parasitaire

Elaborer un modèle analytique du développement des épidémies, ainsi qu'un modèle de fonctionnement des couverts végétaux malades

Obtenir des éléments d'aide à la décision pour l'utilisation raisonnée des traitements phytosanitaires

#### Equipes

Intitulé des Unités	Dept		Statut et nombre de chercheurs /an *				
			1995	1996	1997	1998	1999
Unité de recherche de zoologie, Lusignan (J. Lerin)	SPE	INRA Thésards Post-doc CDD	1	1	2	2	2
Station de Pathologie végétale, Rennes (B. Tivoli, C. Roger*)	SPE	INRA Thésards Post-doc CDI* (UNIP)	1 1 1	1 2 1	1 2 1	1 1 1	1 1 1
Station de bactériologie, Angers (R. Samson)		INRA Thésards Post-doc CDD	1	1	1	1	1

#### Contrats sur la période 1995-1999

Equipe INRA contractante	Partenaires professionnels	Partenaires « recherche »	Origine du financement	Période
Pathologie Végétale (Rennes)	UNIP	Bioclimatologie et Agronomie (Grignon)	UNIP, AIP	1995-1999

#### Autres collaborations nationales et internationales sur le thème :

Interactions fortes avec les collègues du Département EA (B. Ney, M.H. Jeuffroy), avec les bioclimatologistes (L. Huber, Grignon) et avec les modélisateurs (J.S. Pierre, ENSA Rennes).

### Résultats majeurs : (15-20 lignes)

Cette thématique concerne d'une part, un ravageur (le sitone, *Sitona lineatus*) et d'autre part, un champignon aérien (*Mycosphaerella pinodes*) du pois protéagineux. Dans chacun des cas, les équipes se sont attachées à modéliser les phases du développement épidémique de chacun des bioagresseurs.

Dans le premier cas, la modélisation des développements larvaire et embryonnaire en fonction de la température a été réalisée, et les différentes équations nécessitent des ajustements. En ce qui concerne la ponte, diverses tentatives de modélisation ont été menées, mais aucune ne donne pour l'instant satisfaction. L'impact des sitones sur le fonctionnement de la plante est étudié au niveau des relations entre le développement embryonnaire et la destruction des nodosités.

Dans le cas de l'antracnose, les études en épidémiologie menées sur l'antracnose, ont permis de développer dans un premier temps, des modèles descriptifs établissant les relations entre le pathogène (infection, développement de la maladie, apparition des fructifications) et les variables climatiques étudiées (Températures, Eau liquide et Humidité relative saturante). Dans un second temps, ces sous-modèles ont été agrégés dans un modèle analytique décrivant de façon quantitative et dynamique le développement de l'épidémie. Parallèlement, les études concernant la nuisibilité de la maladie et menées à l'échelle de l'organe, de la plante entière et de la plante en situation de peuplement, permettent de préciser l'influence de facteurs aussi essentiels que la période d'attaque, le site de l'attaque sur la plante, et l'intensité de l'attaque, sur l'élaboration du rendement (l'action de la maladie sur l'activité photosynthétique de l'hôte est plus particulièrement étudiée).

### Travaux en cours (5lignes)

En ce qui concerne les **sitones**, plusieurs axes sont en cours d'étude :

- Acquisition des données sur le nombre d'adultes par plante au moment de l'infestation.
- Simulation de la ponte en fonction de la température journalière et obtention du pourcentage du nombre d'oeufs pondus par jour.
- Simulation du développement larvaire en fonction de la température et obtention du pourcentage de chaque stade et de son évolution au cours du temps (modèle qualitatif).
- Introduction des données quantitatives pour obtenir le nombre d'individus de chaque stade au cours du temps. Il faudra, sans doute développer un modèle de mortalité pour corriger les données de ponte initiale.

Dans le cas de l'**antracnose**, il s'agit notamment de recueillir de nouvelles données sur le rôle du facteur variétal sur le développement épidémique, de terminer la modélisation analytique mécaniste et d'entreprendre la modélisation dans une optique d'avertissement des risques épidémiques.

### Perspectives (5 lignes)

Cette démarche pluridisciplinaire vise donc a terme, à élaborer un modèle de fonctionnement des deux pathosystèmes cités ci-dessus, en intégrant pour chacun un modèle analytique épidémiologique principalement basé sur le climat, à un modèle simulant l'impact des épidémies sur la croissance et le développement des couverts végétaux (ces modèles sont en cours d'élaboration).

### Situation de la Recherche : (5 -10 lignes)

- **au plan national** (mentionner si d'autres organismes que l'INRA s'implique dans ce domaine - CNRS, Université, structure privée)

Cette démarche intégrant développement épidémique et fonctionnement des couverts végétaux, est tout à fait original en France; elle s'inscrit dans le cadre de réductions des intrants, et intéresse les structures professionnelles (UNIP, ITCF). Elle s'appuie sur une collaboration indispensable entre bioclimatologistes, modélisateurs, agronomes et pathologistes et entomologistes.

Elle souffre d'isolement et d'une faible possibilité en recrutements dans la mesure où les candidats formés à la discipline sont très rares (conséquence d'une formation initiale des candidats, réduite souvent à la seule "biologie moléculaire").

- **au plan Européen**

Cette thématique est dans l'ensemble, assez isolée en Europe. Il faut cependant citer l'équipe des pathologistes de Cordoue (Espagne) qui développe la même thématique sur l'antracnose du pois chiche.

### - au plan mondial

Cette démarche intégrative est commune avec les grands modèles mondiaux (mildiou/pomme de terre, cercosporiose/arachide, maladies foliaires/blé, . . .); elle a de fervents adeptes en Amérique du Nord et en Australie.

### - Positionnement des équipes INRA dans le contexte international

Les équipes INRA sont reconnues à l'extérieur, notamment par le fait qu'elles ne visent pas seulement à étudier les conséquences des attaques de bioagresseurs sur les peuplements végétaux, mais qu'elles étudient les phénomènes de base (épidémiologie, modèle analytique, perturbations physiologiques, élaboration du rendement) responsables des faits observés.

### Remarques Générales :

Il s'agit ici de thèmes que l'INRA souhaite développer dans les années à venir, en encourageant notamment l'interdisciplinarité SPE-AE-GAP.

Fin du programme bactériologie d'Angers depuis 1998.

### Publications récentes (5-10)

CANTOT P., POGGI C., 1997. Méthodes d'estimation des populations de *Sitona lineatus* en cultures de pois. 4ème conférence intern. sur les ravageurs en Agriculture, Montpellier, 6-8 janvier 1997, éd. ANPP, 3, 1007-1011.

GARRY G., M.H. JEUFFROY, B. NEY, B. TIVOLI, 1998 - Effects of ascochyta blight (*Mycosphaerella pinodes* Berk. and Blox.) on the photosynthesizing leaf area and the photosynthetic efficiency of dried-pea (*Pisum sativum* L.). Plant pathol., 47 : 473-479.

LERIN J., CANTOT P., KOUBAITI K., 1993. Biologie comparée de deux charançons déprédateurs des racines : *Sitona lineatus* L. sur le pois et *Baris coerulescens* Scop. sur colza. 3ème conférence intern. sur les ravageurs en agriculture, Montpellier 7-9 décembre 1993, éd. ANPP, 3, 1149-1156.

LERIN J., HAACK L., CANTOT P., 1997. Influence de la température sur le développement larvaire de *Sitona lineatus* sur pois. 4ème conférence intern. sur les ravageurs en Agriculture, 6-8 janvier 1997, éd. ANPP, 3, 1069-1076

ROGER C., B. TIVOLI, L. HUBER, 1999 - Effects of interrupted wet periods and different temperatures on the development of ascochyta blight caused by *Mycosphaerella pinodes* on pea (*Pisum sativum*) seedlings. Plant pathol., (sous presse).

ROGER C., B. TIVOLI, L. HUBER, 1999 - Effects of temperature and moisture on disease and fruiting body development of *Mycosphaerella pinodes* (BerK; and Blox.) on pea. Plant pathol., (sous presse).

TIVOLI B., C. BEASSE, E. LEMARCHAND, E. MASSON 1996.- Effect of ascochyta blight (*Mycosphaerella pinodes*) on yield components on single pea (*Pisum sativum*) plants under field conditions. Annals of Applied Biology, 129 : 207-216.

## **Transformation des Produits Végétaux**

## INRA - Groupe Filière Protéagineux

### Inventaire des programmes de recherches pour la période 1995-1999

#### Intitulé du Programme de Recherche :

**LES PROTEINES DE LA GRAINE DE POIS : CARACTERISATION ET PROPRIETES.**

#### Objectifs :( 5 lignes)

Permettre une meilleure valorisation alimentaire et non alimentaire des protéines de la graine de pois en :

- Identifiant et caractérisant les facteurs limitant la digestibilité des protéines : identification des peptides résistant à l'hydrolyse *in vivo* et *in vitro* ; caractérisation des facteurs antinutritionnels (inhibiteurs tryptiques)
- Recherche des protéines de la fraction albumine dotées de propriétés fonctionnelles ou intervenant dans la défense de la plante

#### Equipes

Intitulé des Unités	Dept		Statut et nombre de chercheurs /an *				
			1995	1996	1997	1998	1999
Laboratoire de Biochimie et Technologie des protéines	TPV	INRA	2	2	2	2	2
		Thésards	2	2			
		Post-doc		1	1	1	
		CDD			1	1	

#### Contrats sur la période 1995-1999

Equipe INRA contractante	Partenaires professionnels	Partenaires « recherche »	Origine du financement	Période
Station d' Amélioration des Plantes Dijon			AIP	96-98
Ecophysiologie des légumineuses Amélioration des plantes DIJON			AIP	98-2000
Biologie Cellulaire Versailles			Europe	99-2001

#### Autres collaborations nationales et internationales sur le thème :

#### Résultats majeurs : (15-20 lignes)

- **Identification de peptides résistants à l'hydrolyse enzymatique *in vitro* ou *in vivo* (lors de la digestion).**  
Le but de ces études est d'identifier les facteurs liés à la faible digestibilité des protéines de pois qui limitent l'incorporation du pois en alimentation animale. Les protéines sont suivies au cours de l'hydrolyse *in vitro* ou *in vivo* (dans les contenus digestifs chez le poulet) par électrophorèse et identifiées grâce aux anticorps spécifiques (Creveux et al, 1997). Ainsi l'albumine PA<sub>2</sub> et les lectines qui résistent à l'hydrolyse *in vitro* ont été identifiées à la fin de l'iléon chez le poulet.

### - Purification, caractérisation biochimique et structurale des inhibiteurs de protéases de la graine de pois

Le séquençage nous a permis par homologie avec les séquences déjà connues de rattacher les différentes isoformes purifiées à la famille des inhibiteurs de type Bowman-Birk. Les différences de structure primaire des isoformes impliquent l'expression d'au moins deux gènes (Quillien et al., 1997). La structure cristalline de la forme majeure a été affinée jusqu'à une résolution de 2.62 Å (Li de la Sierra et al, 1998). Il s'agit d'un dimère. L'interface entre les deux molécules est caractérisée par des contacts hydrophobes et polaires. Les principales différences structurales entre cette protéine et les protéines homologues cristallisées résident dans la présence d'un dimère qui permet d'observer le segment C-terminal.

### - Identification des protéines qui confèrent à la fraction albumines de pois ses propriétés tensioactives.

Nous avons recherché et mis en évidence des propriétés fonctionnelles intéressantes de la fraction albumines du pois (formation et stabilisation des mousses et des émulsions). Les propriétés fonctionnelles de la fraction albumines ont été attribuées à une protéine majoritairement adsorbée aux interfaces, l'albumine majeure PA2 (Mr 26000).

### - Activité des protéines de pois dans la défense de la plante vis-à-vis des prédateurs.

L'effet toxique des inhibiteurs de protéases vis-à-vis des pucerons a été mis en évidence et le site responsable de cette toxicité a été identifié. Une nouvelle protéine entomotoxique issue de la fraction albumines de la graine de pois (PA1), a été identifiée. Le fort potentiel de cette molécule dans la protection des plantes contre les charançons en fait un candidat potentiellement valorisable.

## Travaux en cours (5lignes)

Purification de l'albumine PA2 et test de ses propriétés fonctionnelles

Identification de la cible des inhibiteurs sachant que les insectes suceurs qui prélèvent les acides aminés libres de la sève élaborée ne possèdent pas de protéases digestives.

Expression hétérologue de gène synthétique codant pour l'albumine PA1

## Perspectives (5 lignes)

Géno plante *arabidopsis*: caractérisation de la composition protéique de mutants de remplissage de la graine afin d'identifier les gènes impliqués dans la régulation de l'expression des protéines de la graine. Transfert des informations avec comme objectifs de limiter le polymorphisme des protéines de la graine de pois.

Géno plante pois : digestibilité *in vitro* des protéines de la graine, afin d'identifier les gènes impliqués dans la variabilité de la qualité nutritionnelle de la graine de pois

Etude des relations structure-fonction des albumines A1b de légumineuses, toxiques pour le charançon.

## Situation de la Recherche : (5 -10 lignes)

- **au plan national** (mentionner si d'autres organismes que l'INRA s'implique dans ce domaine - CNRS, Université, structure privée)

Biogemma : Plante transgénique exprimant PA1

Unip : caractérisation et dosage des inhibiteurs trysiques

- **au plan Européen**

John Innes Centre. Norwich. England. (Domoney, Casey)

TNO Nutrition and Food Research Institute. Wageningen. The Netherlands.

Royal Veterinary and Agricultural University. Chemistry Departement. Denmark. (Sorensen)

- **au plan mondial**

Institute of Biochemistry. Food Science and Nutrition. The Hebrew University of Jerusalem. Israel (Birk)

### - Positionnement des équipes INRA dans le contexte international

L'approche développée sur les relations structure-fonction des protéines de pois est originale au plan international. Cette démarche a permis de développer des collaborations intéressantes au sein de l'INRA soit avec d'autres spécialistes des protéines (INRA Jouy) soit avec des biologistes (INRA\_INSA Lyon) soit avec des nutritionnistes (Nouzilly) ou des généticiens (Dijon). Cette approche multidisciplinaire constitue un point fort au plan international. Toutefois des faiblesses existent dans le domaine de la modélisation de la structure des

protéines et de la biologie moléculaire (ingénierie moléculaire). Les équipes américaines (soja, haricot) ou australiennes ont engagé des travaux prometteurs dans ce domaine.

### Remarques Générales :

Des études importantes ont été menées avant 1995 sur la caractérisation biochimique, physicochimique et fonctionnelle des protéines majeures du pois (légumine, viciline) et sur la variabilité de composition protéique de la graine de pois. Ces travaux ont été mis en veille pour des raisons scientifiques liées à la complexité structurale de ces familles protéiques mais aussi du fait de l'absence d'une stratégie claire concernant les valorisations des protéines du pois.

### Publications récentes (5-10)

- CREVIEU I., BEROT S. AND GUEGUEN J. : 1996. Large scale procedure for fractionation of albumins and globulins from pea seeds. *Nahrung*, 40, (5), 237-244
- CREVIEU I., CARRE B., CHAGNEAU A.M., GUEGUEN J., MELCION J.P. : 1997. Effect of particle size of pea (*Pisum sativum* L) flours on the digestion of their proteins in the digestive tract of broilers. *J. Sci Food Agric.*, 75, 217-226
- CREVIEU I., CARRE B., CHAGNEAU A.M., QUILLIEN L., GUEGUEN J., BEROT S. (1997). Identification of resistant pea protein in the digestive tract of chickens. *J. Agric. Food Chem.* 45, 4, 1295-1300.
- PERROT C., QUILLIEN L., GUEGUEN J. (1999). Immunoblotting identification of resistance pea (*Pisum sativum* L) proteins to *in vitro* enzymatic hydrolysis. (soumis). *Sci. Aliments*.
- FERRASSON E., QUILLIEN L., GUEGUEN J. (1997). Proteinase Inhibitor from Pea Seeds : Purification and Characterization. *J. Agric. Food Chem.* 45, 1, 127-131.
- QUILLIEN L., FERRASSON E., MOLLE D., GUEGUEN J. (1997). Trypsin Inhibitor Polymorphism : Multigene Family Expression and Post-Translational Modification. *J. Prot. Chem.* 16, 3, 195-203.
- LI de la SIERRA I., QUILLIEN L., FLECKER P., GUEGUEN J., BRUNIE S. (1998). Dimeric crystal structure of a Bowman-birk proteinase inhibitor from pea seeds. *J. Mol. Biol.* (accepté)
- QUILLIEN L., RAHBE Y., GUEGUEN J. (1998). Anti aphid effect of trypsin inhibitors from pea seeds. *In* : Proceedings of the 3<sup>rd</sup> AEP Conference "Opportunities for high quality, healthy and added-value crops to meet European demands". Valladolid, Spain.

## INRA - Groupe Filière Protéagineux

### Inventaire des programmes de recherches pour la période 1995-1999

#### Intitulé du Programme de Recherche :

**MODIFICATIONS CHIMIQUES ET ENZYMATIQUES DE PROTEINES DE RESERVE DE LEGUMINEUSES**

#### Objectifs :( 5 lignes)

Ce programme vise l'amélioration des propriétés fonctionnelles des protéines de réserve des légumineuses, sous forme purifiée ou bien sous forme d'isolat, en utilisant des modifications chimiques ou enzymatiques. Les propriétés suivantes ont été étudiées : la solubilité, les propriétés moussantes, émulsifiantes et gélifiantes ainsi que la valeur nutritionnelle par amélioration du contenu en phosphate et par fixation de minéraux (Fe, Ca). Dans le cas des modifications chimiques les travaux les plus récents ont porté sur la phosphorylation et la désamidation. Pour la voie enzymatique, deux types d'enzymes ont été utilisés : des transglutaminases qui catalysent la formation de liaisons isopeptidiques (Gln-Lys) et des protéines-kinases qui catalysent des réactions de phosphorylation.

#### Equipes

Intitulé des Unités	Dept		Statut et nombre de chercheurs /an *				
			1995	1996	1997	1998	1999
LCB-Grignon	TPV	INRA Thésards Post-doc CDD	1,5	1,5	1,5	1,5	1
LBTP-Nantes	TPV	INRA Thésards Post-doc CDD	0,5 0,5 0,5	0,5	0,2	0,2	-
		INRA Thésards Post-doc CDD					

#### Contrats sur la période 1995-1999

Equipe INRA contractante	Partenaires professionnels	Partenaires « recherche »	Origine du financement	Période
LCB-Grignon		Schomburg Dietmar Université de Cologne	Programme Franco Allemand Procope	1999-2000

#### Autres collaborations nationales et internationales sur le thème :

#### Résultats majeurs : (15-20 lignes)

La désamidation de la glycine de soja a été obtenue par des traitements acide ou basique, dans ces deux cas des taux maximums de désamidation de 25 et 35 % ont été atteints. Ces modifications entraînent une dissociation progressive de la molécule de glycine suivie d'une dénaturation. Après réduction, les produits désamidés présentent une bonne solubilité, leurs propriétés d'adsorption à une interface eau-air sont accrues et ne sont plus

dépendantes de la force ionique du milieu. Ces modifications entraînent une amélioration notable de la capacité moussante et de la stabilité des mousses.

L'optimisation des conditions de la réaction de phosphorylation a permis de fixer jusqu'à 20 mol P/mole de globuline 7S ou 11S. Ces modifications entraînent une augmentation de la solubilité des globulines entre pH 4,5 et 7 et améliorent leurs propriétés moussantes et émulsifiantes.

L'augmentation des charges négatives sur un isolat de pois (phosphorylation ou succinylation) permet d'augmenter sa capacité de fixation du calcium. La phosphorylation des globulines de soja par l'ATP ou du pyrophosphate en présence de  $Fe^{3+}$  permet d'incorporer simultanément du fer et du phosphate, probablement sous forme de complexes.

Les globulines de soja et de pois ont été phosphorylées par la protéine kinase CK2 de *Yarrowia lipolytica*. Sous leur forme native, la  $\beta$ -conglycinine incorpore 0,73 mol P/mol et la glycinine 0,20 mol P/mol. Le phosphore est incorporé spécifiquement dans certaines sous-unités ( $\alpha$  et  $\alpha'$  pour la  $\beta$ -conglycinine et A pour la glycinine) bien que toutes possèdent des sites potentiels de phosphorylation (S/T-X-X-D/E). En ce qui concerne la sous-unité purifiée  $\alpha$  de la  $\beta$ -conglycinine, seuls deux sites de phosphorylation ont été identifiés (Ser 75 et Ser 117) parmi les six sites potentiels. Ce résultat met en évidence les limites de prédiction des sites de phosphorylation. Dans le cas des globulines de pois, le phosphore est incorporé spécifiquement dans les polypeptides de 47 et 23 kDa de la viciline et les polypeptides acides A de la légumine. Une succinylation extensive des globulines de pois permet d'augmenter leur phosphorylation. La phosphorylation par la CK2 de ces protéines améliore grandement leur solubilité à pH acide ainsi que leur capacité à fixer le fer qui est multipliée par 6 pour la  $\beta$ -conglycinine et par 2 pour l'isolat de soja.

L'utilisation de transglutaminase capable de catalyser la formation de liaisons isopeptidiques a permis de polymériser les globulines de pois. Dans le cas de la légumine native, seul le polypeptide acide A est accepté comme substrat par l'enzyme, la polymérisation se fait donc uniquement par son intermédiaire. Une dénaturation partielle de ces protéines par acylation augmente notablement le nombre de sites accessibles à l'enzyme, le polypeptide B devient substrat de la transglutaminase. L'utilisation de cette enzyme dans des solutions concentrées d'isolats a permis d'abaisser la concentration minimale requise pour gélifier.

### Travaux en cours (5 lignes)

Nous effectuons une mutagenèse dirigée de la CK2 pour obtenir une protéine qui utilise le pyrophosphate comme donneur de phosphate. Nous avons pris comme modèle la phosphofructokinase, qui utilise naturellement selon l'organisme par lequel elle est produite, l'ATP ou le pyrophosphate pour phosphoryler le fructose-6-P (Thèse de D. Chaillot, en cours).

Nous cherchons à obtenir d'autres protéines-kinases de spécificité complémentaire (protéine kinase CK1, protéine tyrosine kinase...) afin d'augmenter le nombre d'acides aminés cibles de la phosphorylation.

### Perspectives (5 lignes)

L'association de plusieurs protéines-kinases de spécificité complémentaire devrait conduire à un taux de phosphorylation plus élevé et permettre une modification significative de certaines propriétés fonctionnelles.

L'étude sera étendue à d'autres protéagineux (haricot, lupin...) en s'appuyant sur les homologues qui existent entre leurs protéines. La protéolyse des protéines modifiées sera étudiée afin d'obtenir des peptides phosphorylés qui n'existent pas naturellement. On testera les propriétés fonctionnelles, voire, biologiques de ces peptides.

### Situation de la Recherche : (5 -10 lignes)

La recherche du point de vue modifications chimiques est quasiment arrêtée du fait du peu d'intérêt en terme d'application industrielle alimentaire. Elle reste cependant un outil intéressant pour des études de relations structure-fonction et éventuellement pour des applications à visées non alimentaires.

Les modifications enzymatiques sont plus prometteuses d'un point de vue application, au moins pour les consommateurs mais leur coût actuel en limite les applications. Néanmoins, la recherche de nouveaux types d'enzymes ou d'enzymes produites à de plus faibles coûts reste un sujet d'actualité.

- au plan national

- au plan Européen

Dr Schwenke : Institut für Agewandte Proteinchemie, Strahnsdorfer Damm 81, D 14352 Kleinmachnow, Allemagne

### - au plan mondial

Dr Shih : Southern Regional Research Center, USDA, 1100 Robert E. Lee Boulevard, P.O. Box 19687, New Orleans, Louisiana 70179

### - Positionnement des équipes INRA dans le contexte international

Reconnaissance internationale : participation sur ce thème à deux congrès européens (Gluten biopolymer, Enhance). Communication invitée à des congrès aux USA.

### Remarques Générales :

#### Publications récentes (5-10)

- Ralet M.C., Fouques D., Léonil J., Mollé D. et Meunier J.C., 1999. Soybean  $\beta$ -conglycinin  $\alpha$  subunit is phosphorylated on two distinct serines by protein kinase CK2 *in vitro*. *J. Prot. Chem.*, **18**, 315-323.
- Sitohy M., Popineau Y., Chobert J.M., Haertle T. 1999. Mild method of simultaneous methionine grafting and phosphorylation of soybean globulins improves their functional properties. *Nahrung*, **43**, 3-8.
- Chardot T., Benetti P.H., Kim S.I., Fouques D., Ralet M.C. et Meunier J.C., 1998. Enzymatic and non enzymatic phosphorylation of plant storage proteins. In : Gueguen J., Popineau Y. (eds), *Plant Proteins from European Crops*, 136-140, INRA, Springer Verlag, Paris, Heidelberg.
- Chardot T., Benetti P.H., Canonge M., Kim S.I., Chaillot D., Fouques D. et Meunier J.C., 1998. Enzymatic phosphorylation of food proteins by purified and recombinant protein kinase CK2. *Nahrung*, **42**, 145-147.
- Dudeck S., Guéguen J., Krause J.P., Schwenke K.D. 1998. Functional properties of the alpha-chain of a major legumin subunit of *Pisum Sativum* legumin. *Nahrung*, **42**, 1, 2-6
- Fouques D., Ralet M.C., Chardot T. et Meunier J.C., 1998. Enzymatic phosphorylation of seed globulins. Comparison between pea and soybean. In : Gueguen J., Popineau Y. (eds), *Plant Proteins from European Crops*, 162-166, INRA, Springer Verlag, Paris, Heidelberg.
- Fouques D., Ralet M.C., Mollé D., Léonil J. et Meunier J.C., 1998. Enzymatic phosphorylation of soy globulins by the protein kinase CK2. Determination of the phosphorylation sites of  $\beta$ -conglycinin  $\alpha$  subunit by mass spectrometry. *Nahrung*, **42**, 148-150.
- Guéguen J., Larré C. and Michon T. 1997 Crosslinking of plant proteins by enzymes, *Les enzymes dans l'industrie alimentaire*, EFF'97, CBB Développement, France
- Chiarello M.D., Larré C., Kedzior Z.M., and Guéguen J. 1996. Pea seedling extracts catalyzed protein amine binding and protein cross-linking. 1. Evidence for the rôle of a diamine oxidase 2. Contribution of diamine oxidase to their reactions. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, (11), 3717-3726.
- Ralet M.C., Fouques D., Chardot T. et Meunier J.C., 1996. Enzymatic phosphorylation by a casein kinase II of native and succinylated soy storage proteins glycinin and  $\beta$ -conglycinin. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 69-75.
- Chobert J.M., Briand L., Guéguen J., Popineau Y., Larré C., and Haertle T. 1996. Recent advances in enzymatic modifications of food proteins for improving their functional properties. *Nahrung*, **40**, (4), 177-182.
- Larré C., Desserme C., Sitohy M.Z., Sorensen J. and Guéguen J. 1995. Chelating properties of legume seeds modified proteins. *Proceedings of 2<sup>nd</sup> European Conference on Grain Legumes : improving production and utilisation of grain legumes*, Copenhagen, Denmark, p. 362-364.

## INRA - Groupe Filière Protéagineux

### Inventaire des programmes de recherches pour la période 1995-1999

#### Intitulé du Programme de Recherche :

#### UTILISATION DES PROTEINES DE PROTEAGINEUX POUR LA PREPARATION DE BIOMATERIAUX

#### Objectifs :( 5 lignes)

Les recherches ont pour objectif d'examiner les potentialités des farines de légumineuses (pois, fève, soja) et de leurs dérivés pour la préparation de matériaux renouvelables et biodégradables, qu'il s'agisse de films, d'objets 3D ou de nano et microparticules. Ces travaux sont organisés suivant deux orientations principales :

- la compréhension des mécanismes physicochimiques de formation des réseaux de biopolymères( protéine, amidon) en liaison avec la structure des macromolécules et les procédés de mise en forme
- l'influence des modifications chimiques des macromolécules, de la formulation et des procédés de mise en forme sur les propriétés mécaniques, barrières à l'eau et aux gaz, hydrophiles des matériaux.

#### Equipes

Intitulé des Unités	Dept		Statut et nombre de chercheurs /an *				
			1995	1996	1997	1998	1999
Unité de Biochimie et Technologie des Protéines (UBTP-Nantes)	TPV	INRA Thésards Post-doc CDD	1,5	1,5	1	0,5	0
Phytec Nantes		INRA Thésards Post-doc CDD		0,7	0,2 0,8	0,2	0
		INRA Thésards Post-doc CDD					

#### Contrats sur la période 1995-1999

Equipe INRA contractante	Partenaires professionnels	Partenaires « recherche »	Origine du financement	Période
UBTP-Nantes	UNIP- ONIDOL	INRA- Phytec	UNIP-ONIDOL	1995-96
UBTP_Nantes	GEMEF, SOTEXPRO, UNIP	INRA:Phytec, UEIMA ENITIA,CTTM,ENSCT	ADEME, UNIP,GEMEF	1996-98

#### Autres collaborations nationales et internationales sur le thème :

Ecole Nationale Supérieure de chimie de Toulouse:

CNRS URA 44538, Laboratoire des Matériaux, Physicochimie des Solides (A. Lebugle)  
Laboratoire de Chimie Agro industrielle ( Z. Moulougui)

Centre de Transfert de Technologie du Mans - Département Matériaux ( P. Noireaux)

Université de Rouen (Lab. Pharmacochimie et Biopharmacie, A.M. Orechioni)

### Résultats majeurs : (15-20 lignes)

Les conditions de préparation de matériaux à partir de farine de pois et des produits industriels dérivés (isolés, concentrés) ont été définies. Les isolés protéiques sont bien adaptés à la fabrication de films (30-200 $\mu$ m), dont les caractéristiques mécaniques moyennes sont les suivantes: contrainte 2 MPa, allongement 100-150%. On peut obtenir des matériaux très résistants (25MPa) et peu élastiques par un traitement complémentaire de réticulation par les aldéhydes. La technologie de filage des protéines a été transposée pour produire ces films au niveau pilote en bande de 14 cm de large et plusieurs mètres de long. Par extrusion et injection-moulage, des objets 3D rigides (contrainte 10-28 MPa, allongement 1,5-14%) ont été obtenus à partir de farine de pois et des fractions turboséparées. Les conditions d'extrusion et d'injection doivent être modifiées en fonction de la composition biochimique de la matière première et en particulier du rapport protéine/amidon.

La principale limite à l'utilisation de ces matériaux, films ou objets 3D, reste leur très grande capacité d'absorption d'eau. Des travaux importants ont été menés pour les hydrofuger, soit par modification chimique des protéines, soit par addition d'hydrofugeants dans la masse ou par enrobage, soit par traitement de surface sous rayonnement UV. Des molécules photoréactives ont été synthétisées à cet effet. La voie la plus prometteuse concerne l'utilisation de plastifiants réactifs. Des résultats intéressants ont été obtenus qui montrent que la réticulation de plastifiant réactif par un traitement UV limite considérablement l'absorption d'eau.

Parallèlement à cette voie, des nanoparticules (taille 200 à 300nm) ont pu être préparées à partir de légumine et de viciline de pois par diverses techniques de coacervation; elles constituent de nouvelles formes cosmétologiques ou pharmaceutiques qui permettent de contrôler la biodisponibilité des principes actifs ou contribuent à protéger les molécules actives contre des processus d'inactivation.

Enfin des travaux sur des films modèle préparés à partir de protéines de pois et de soja purifiées ont montré que des changements conformationnels importants interviennent au cours de la formation du matériau et mettent en évidence l'apparition de structures en feuillets  $\beta$  intermoléculaires reliés par liaisons hydrogènes. On peut penser que ces régions constituent des zones de jonction au niveau du réseau protéique et sont importantes pour expliquer les propriétés mécaniques du film.

### Travaux en cours (5lignes)

Les travaux sur les protéines de légumineuses sont actuellement arrêtés. Compte tenu des financements en cours, l'effort de recherche concerne principalement les protéines de blé et de colza.

### Perspectives (5 lignes)

L'intérêt de la profession partenaire nous incite à poursuivre sur les biomatériaux mais aussi sur l'encapsulation. Parallèlement à des travaux finalisés sur la mise en forme et la caractérisation des matériaux des travaux de base doivent être conduits sur les mécanismes d'agrégation des protéines au cours de la formation du réseau protéique et sur les interactions du matériau avec l'eau.

### Situation de la Recherche : (5 -10 lignes)

**- au plan national** (mentionner si d'autres organismes que l'INRA s'implique dans ce domaine - CNRS, Université, structure privée)

Ecole Nationale Supérieure de chimie de Toulouse:

CNRS URA 44538, Laboratoire des Matériaux, Physicochimie des Solides (A. Lebugle)

Laboratoire de Chimie Agro industrielle ( Z. Moulougui)

CIRAD Montpellier (protéines de coton)

ENSAM Montpellier (protéines de céréales)

### - au plan Européen

ATO-DLO (Wageningen NL) : expérience dans le domaine des biomatériaux (principalement soja, blé)

Fraunhofer Institute (Freising, D) : biomatériaux à partir de lupin

### - au plan mondial

Des recherches sur les applications non-alimentaires des protéines sont effectuées sur le soja aux USA (matériau, colles, adhésifs).

### - Positionnement des équipes INRA dans le contexte international

Reconnaissance sur les mécanismes physicochimiques qui conduisent à la formation des agromatériaux .  
Position plus faible dans le domaine des procédés de mise en forme du fait de l'absence d'équipements en génie des procédés

### Remarques Générales :

#### Publications récentes (5-10)

IRACHE J.M., BERGOUGNOUX L., ESPELETA I., GUEGUEN J., ORECCHIONI A.M. : **1995**. Optimisation and in vitro stability of legumin nanoparticles obtained by coacervation method. *Int. J. Pharmaceutics*, 126, 103-109

LEBUGLE A., SUBIRADE M. AND J. GUEGUEN : **1995**. Structural characteristics of a globular protein film investigated by X-Ray Photoelectron Spectroscopy : comparison between a legumin film and a powdered legumin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1248, 107-114

EZPELETA I., IRACHE J.M., STAINMESSE S., GUEGUEN J., ORECCHIONI A.M. : **1996**. Preparation of Small-Sized Particles from Vicilin (Vegetal Protein from *Pisum Sativum* L.) by Coacervation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 42 (1), 36-41

LEGRAND J., GUEGUEN J., BEROT S., POPINEAU Y., NOURI L. : **1997**. Acetylation of pea isolate in a torus microreactor. *Biotechnology & Bioengineering*, 53, 4, 409-414

EZPELETA I., IRACHE J.M., GUEGUEN J. AND ORECCHIONI A.M. : **1997**. Properties of glutaraldehyde cross-linked vicilin nano- and microparticles. *J. Microencapsulation*, 14, 5, 557-565

GUEGUEN J., VIROBEN G., NOIREAUX P., SUBIRADE M. : **1998**. Influence of plasticizers and treatments on the properties of films from pea proteins. *Industrial crops and products*, 7, 149-157

SUBIRADE M., KELLY I., GUEGUEN J., PEZOLET M. : **1998**. Molecular basis of film formation from a soybean protein : comparison between the conformation of glycinin in aqueous solution and in films. *Int. J. of Biological Macromolecules*, 23, 241-249

GUEGUEN J., VIROBEN G., BARBOT J., SUBIRADE M. *Comparative properties of pea protein and wheat gluten films. Influence of various plasticizers and aging. Communication orale.* Conference on Plant Proteins from European Crops. Food and non-food applications. Nantes, France. 25-27 novembre 1996. 319-323, **1998**

COLLIN S., DOUSSINAULT V., MELCION J.P., GUEGUEN J., Non\_food use of pea: characterisation of hydrophobic properties of biomaterials. Actes de "3<sup>rd</sup> European Conf. On grain legumes", Valladolid (Spain), **1998**, 50-51.

## INRA - Groupe Filière Protéagineux

### Inventaire des programmes de recherches pour la période 1995-1999

#### Intitulé du programme de recherche

**MODELISATION MECANIQUE ET RHEOLOGIQUE DE LA FRAGMENTATION DES GRAINES PROTEAGINEUSES.**

#### Objectifs

Comprendre les mécanismes mis en jeu au cours de la fragmentation des graines protéagineuses (décorticage, broyage) et de la séparation des particules obtenues,  
Mettre en relation le comportement à la fragmentation et à la séparation avec les caractéristiques des substrats pour définir une « fractionnabilité » intrinsèque de la graine.

#### Intitulé des Unités :

Phytec Nantes  
TPV  
0,1 IR + 0,1 DR sur 1995, 1996, 1997, 1998

#### Contrats sur la période

PEA Programme (Pulse for European Agro-industry) :  
cadre européen, coordination UNIP (terminé en 1995)

AIP Aliman : Parois cotylédonnaires des protéagineux (pois, féveroles). Eléments de génétique végétale et mesure de leur impact sur la valeur nutritionnelle des graines.

INRA : SGAP Dijon, coord, Zootechnie Dijon, SRP St-Gilles, SRA Nouzilly (1996-1997), financement INRA

#### Autres collaborations

Université Agricole de Lublin (Pologne)

#### Résultats majeurs

Le comportement à la fragmentation de protéagineux (pois et féveroles) à teneur variable en parois cellulaires est étudié au moyen de la méthodologie dite de broyage séquentiel ou dynamique utilisant les chaînes de Markov. Un premier examen des matrices de transition fait apparaître des différences de comportement entre variétés de pois pour une humidité équivalente. Le cultivar Amino tend à éclater spontanément en très fines particules sous l'influence d'un seul impact au contraire du cultivar Madria dont le broyage nécessite plusieurs impacts successifs. Le couplage entre taille de particules et leur composition apparente évaluée par spectroscopie dans le proche-infra rouge est à affiner. Sur les féveroles, les résultats sont en cours de dépouillement.

#### Travaux en cours

Adaptation des dispositifs d'étude et des procédures d'évaluation de l'aptitude au broyage  
Etudes des facteurs d'influence : origine génétique, conditions agronomiques, humidité.

## Perspectives :

Explorer l'application de la démarche séquentielle à la séparation des particules par voie sèche (tamisage, turboséparation, tri densimétrique).

## Situation de la recherche

L'aptitude intrinsèque d'une graine au fractionnement, la manière dont elle se fragmente, est une préoccupation mal résolue. Elle est souvent exprimée par la notion de « dureté » historiquement appliquée aux blés. La méthodologie dite « de broyage dynamique » n'est étudiée nulle part ailleurs à notre connaissance. Le couplage aux méthodes de mesure rapide est un avantage à exploiter.

## Publications

DEVAUX Marie-Françoise, PATARD G., MELCION J-P., 1998. Multidimensional analysis for the interpretation of particle size distribution of ground raw materials used in feed industry (poster). 7<sup>th</sup> European Symp. on Particle Characterization, Nürnberg (Germany), 10-12th march., 8 p.

BERTRAND D., GUIBERT D., MELCION J-P., 1998. Evolution of the chemical composition of pea seeds according to particle size during comminution using a markovian process (oral presentation). 9<sup>th</sup> European Symp. on Comminution, Albi (France), 8-10<sup>th</sup> sept., 175-184.

GUIBERT D., BERTRAND D., MELCION J-P., 1998. Description of the grinding behaviour of pea seeds using as a markovian process (poster). 3<sup>rd</sup> European Conf. on Grain Legumes, Valladolid (Spain), 14-19 nov, 450-451.

MAAROUFI Chiraze, MELCION J-P., Le DESCHAULT de MONREDON F., GIBOULOT B., GUIBERT D., CHAPOUTOT P., GIGER-REVERDIN Sylvie, SAUVANT D., LE GUEN Marie-Pierre, 1998. Grinding classification of pea seeds (poster). 3<sup>rd</sup> European Conf. on Grain Legumes, Valladolid (Spain), 14-19 nov, 448-449.

## INRA - Groupe Filière Protéagineux

### Inventaire des programmes de recherches pour la période 1995-1999

#### Intitulé du programme de recherche

**CARACTERISTIQUES PHYSIQUES DES PULVERULENTS ISSUS DE GRAINES PROTEAGINEUSES ET CONSEQUENCES NUTRITIONNELLES OU COMPORTEMENTALES POUR LES ANIMAUX**

#### Objectifs

Obtenir et caractériser des particules (granulométrie, aire massique) obtenues à partir de graines protéagineuses afin de mettre ces caractéristiques en relation avec le comportement alimentaire, le site de digestion et la dégradabilité.

#### Intitulé des Unités :

Phytec Nantes  
TPV  
0,3 IR sur 1995, 1996, 1997, 1998

#### Contrats sur la période :

PEA Programme (Pulse for European Agro-industry) :  
cadre européen, coordination UNIP (terminé en 1995)

AIP Aliman : Parois cotylédonnaires des protéagineux (pois, féveroles). Eléments de génétique végétale et mesure de leur impact sur la valeur nutritionnelle des graines.

INRA : SGAP Dijon, coord, Zootechnie Dijon, SRP St-Gilles, SRA Nouzilly (1996-1997), financement INRA

Contrat Sypram : Comportement alimentaire et technologie des aliments pour volailles (1992-1995).  
INRA : SRA Nouzilly, Industriels participants. Financement Fond Sypram.

Contrats industriels avec le GIE Euretec II, en particulier celui intitulé « Optimisation de la valorisation des oléo-protéagineux par le ruminant : influence de la granulométrie et des chaînes carbonées associées » (1995-1999).

INRA INA P-G, SRA Nouzilly, Financements industriels.

1 thèse en voie d'achèvement (1999)

#### Autres collaborations :

néant

#### Résultats majeurs récents :

Un classement des particules de pois broyé (variété Solara) entraîne une variation de leur composition qui peut être mise à profit pour moduler la cinétique de dégradation ruminale et le site de digestion chez le ruminant.

Les caractéristiques granulométriques sont à prendre en compte dans le système d'évaluation INRA de la valeur azotée des matières premières en général et des protéagineux en particulier (système PDI).

#### Travaux en cours

Les travaux sur ce thème sont actuellement en suspens.

## Perspectives

Modulation par le contrôle de la granulométrie de l'excrétion de l'azote endogène par le porc en vue de favoriser une utilisation plus efficace des protéines de différentes variétés de pois, et de limiter les rejets.

## Situation de la recherche

Il s'agit d'une recherche essentiellement appliquée, concernant davantage la profession de l'alimentation animale. Les équipes hollandaises travaillent également sur ce thème.

La force de l'INRA dans ce contexte est l'association étroite entre équipes de nutritionnistes d'espèces (volailles, ruminant, porc) et technologues.

## Publications récentes :

CARRE B., MELCION J-P., WIDIEZ J-L., BIOT P., 1998. Effects of various processes of fractionation, grinding and storage of peas on the digestibility of pea starch in chickens. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **71**, 19-33.

HESS V., THIBAUT J.N., DUC G., MELCION J-P., VAN EYS J., SEVE B., 1998. Influence de la variété et du microbroyage sur la digestibilité iléale de l'azote et des acides aminés de pois. Digestibilité réelle de l'azote et pertes endogènes spécifiques. *J. Rech. Porcine en France*, Paris (France), **30**, 223-229.

MAAROUFI Chiraze, CHAPOUTOT P., GIGER-REVERDIN Sylvie, SAUVANT D., MELCION J-P., Le DESCHAULT de MONREDON F., GIBOULOT B., GUIBERT D., LE GUEN Marie-Pierre, 1998. Influence of pea particle sizes on the gas production kinetic with rumen juice (HFT Method) (poster). 3<sup>rd</sup> European Conf. on Grain Legumes, Valladolid (Spain), 14-19 nov, 452-453.

CREVIEU-GABRIEL Irène, CARRE B., GOMEZ Joëlle, QUILLIEN Laurence, GUEGUEN J., BEROT S., MELCION J-P., 1998. Pea (*Pisum sativum* L.) protein digestion in broilers (oral presentation). 3<sup>rd</sup> European Conf. on Grain Legumes, Valladolid (Spain), 14-19 nov, 14-15.

PICARD M., GIBOULOT B., MELCION J-P., 1997. Miettes ou éclats de graines d'aspect semblable sont identifiés par le jeune poulet. 2<sup>o</sup> J. Rech. Avicole, Tours (France), 8-10 avril, 197-200.

**Nutrition, Alimentation  
et  
Sécurité Alimentaire**

## INRA - Groupe Filière Protéagineux

### Inventaire des programmes de recherches pour la période 1995-1999

#### Intitulé du Programme de Recherche :

- 1) ELIMINATION DES COMPOSANTS GLUCIDIQUES A L'ORIGINE DES FLATULENCES CONSECUTIVES A LA CONSOMMATION DE LEGUMES SECS
- 2) PROJET : LES LEGUMES SECS, DES ALIMENTS BONS POUR LA SANTE, COMMENT LE PROUVER ?

#### Objectifs :( 5 lignes)

1) Les  $\alpha$ -galactosides et probablement une fraction des glucides solubles sont responsables des flatulences. Le projet vise à mettre au point des moyens efficaces pour les éliminer. Les techniques de trempage ayant été déjà très explorées, nous testons la fermentation (naturelle ou induites par des ferments) et des traitements enzymatiques.

2) Les légumes secs sont des sources de glucides lents. Nous voulons tester l'hypothèse qu'une consommation régulière de ces aliments diminuerait les risques d'apparition d'une insulino-résistance chez des sujets « à risque ».

#### Equipes

Intitulé des Unités	Dept	Statut et nombre de chercheurs /an *					
			1995	1996	1997	1998	1999
Unité Fonctions Digestives et Nutrition Humaine	NASA	INRA Thésards Post-doc CDD			1	1 1**	1 2**
		INRA Thésards Post-doc CDD					
		INRA Thésards Post-doc CDD					

\* sur projets « légumes secs »

\*\*je suis « tuteur » de ces 2 thésards étrangers (Vénézuéla, Côte d'Ivoire). Tous les 2 réalisent une partie de leur thèse dans mon laboratoire, sous ma direction.

#### Contrats sur la période 1995-1999

Equipe contractante	INRA	Partenaires professionnels	Partenaires "recherche"	Origine du financement	Période

#### Autres collaborations nationales et internationales sur le thème :

Université Simon Bolivar, Caracas, Vénézuéla : Marisela Granito (thésard)

Université d'Abidjan, Côte d'Ivoire : David Kouakou Brou (thésard), Dago Gnakri (Maître de Conférence).

### Résultats majeurs : (15-20 lignes)

- 1) La cofermentation de plusieurs matières premières d'origine Ivoirienne (dont le haricot) peut être utilisée pour éliminer les phytates et les  $\alpha$ -galactosides de farines destinées à l'alimentation infantile.
- 2) Les  $\alpha$ -galactosides à eux seuls ne peuvent expliquer les flatulences consécutives à la consommation de haricot.

### Travaux en cours (5lignes)

Des essais de fermentation naturelle et contrôlée sont en cours sur le haricot (essais réalisés au Vénézuéla). L'utilisation d'enzymes est testée pour éliminer tout ou partie des glucides solubles de haricots.

### Perspectives (5 lignes)

Un projet va être déposé en réponse à l'appel à projet de recherche Ministériel « Aliment-Qualité-Sécurité » (intitulé du projet : Les légumes secs - un aliment bon pour la santé. Comment le prouver ? Comment faire passer le message aux consommateurs ?). Le projet vise à impliquer la filière « légumes secs » et en particulier 1) des producteurs, 2) une ou plusieurs industries agro-alimentaires françaises qui assurent la transformation de ces produits, 3) des nutritionnistes qui s'intéressent à la prévention par l'alimentation de maladies métaboliques courantes ainsi que 4) les consommateurs à travers une de leurs associations.

Un projet plus ambitieux mais sur la même thématique devrait être déposé à l'un des prochains appels d'offre européen.

### Situation de la Recherche : (5 -10 lignes)

**- au plan national** (mentionner si d'autres organismes que l'INRA s'implique dans ce domaine - CNRS, Université, structure privée)

A ma connaissance rien n'est fait dans ce domaine en France.

#### - au plan Européen

Les équipes qui travaillent sur la prévention des flatulences sont surtout des équipes de technologues et biochimistes. Il s'agit principalement d'une équipe espagnole (Dr. Vidal et collaborateurs, Madrid) et d'une équipe polonaise (Pr. Kozłowska). Les généticiens se sont également penchés sur ce problème et en particulier ceux du John Innes Institute à Norwich.

#### - au plan mondial

Peu de recherche sur ce thème en dehors de l'Europe.

#### - Positionnement des équipes INRA dans le contexte international

Mon sentiment est que plusieurs équipes françaises INRA disposent des moyens techniques et des compétences qui permettraient des recherches de bon niveau permettant d'avancer des arguments solides pour promouvoir la consommation de légumes secs en France.

### Remarques Générales :

#### Publications récentes (5-10)

Noah L, Guillon F, Bouchet B, Buléon A, Molis C, Gratas M, Champ M. Digestion of carbohydrate from home cooked white beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in healthy humans. *Journal of Nutrition*, (1998).

Gatel F., Champ M. 1998. Grain legumes in human and animal nutrition - Up to date results and question marks. 3rd European Conference on Grain Legumes. Valladolid (Espagne) Novembre 1998. pp. 7-11.

## **Elevage et Nutrition des Animaux**

# INRA - Groupe Filière Protéagineux

## Inventaire des programmes de recherches pour la période 1995-1999

### Intitulé du Programme de Recherche :

#### DIGESTION DES PROTEINES DE POIS CHEZ LE POULET

#### Objectifs :( 5 lignes)

Mettre en évidence l'origine de la variabilité de la digestion des protéines de pois chez le poulet (67-83%) par une approche biochimique. Etude de l'effet de la structure des protéines et de la granulométrie.

#### Equipes

Intitulé des Unités	Dept		Statut et nombre de chercheurs /an *				
			1995	1996	1997	1998	1999
Station de Recherches Avicoles	ENA	INRA	1	1	1		
		Thésards	1	1	1		
		Post-doc					
		CDD					
Laboratoire de Biochimie et Technologie des Protéines	TPV	INRA	1	1	1		
		Thésards					
		Post-doc					
		CDD					

#### Contrats sur la période 1995-1999

Equipe contractante	INRA	Partenaires professionnels	Partenaires « recherche »	Origine du financement	Période

#### Autres collaborations nationales et internationales sur le thème :

#### Résultats majeurs : (15-20 lignes)

Pour connaître l'origine de la variabilité de la digestibilité des protéines chez les oiseaux, on a étudié d'une part l'effet de la structure des protéines, d'autre part l'effet de la taille des particules de l'aliment.

##### - Effet de la structure des protéines

Les protéines de pois sont constituées de trois fractions protéiques : les globulines (protéines majeures), les albumines, et les protéines dites 'insolubles'. L'analyse des protéines alimentaires encore présentes en fin de tube digestif montre que certaines sont moins sensibles à l'hydrolyse que d'autres. Ainsi, parmi les albumines, la PA2 et les lectines, et parmi les globulines, des polypeptides de 20-25 kDa, issus vraisemblablement des légumineuses, sont détectés jusqu'à la fin de l'iléon. Par ailleurs, la digestibilité fécale apparente des protéines d'un régime contenant comme unique source de protéine, du pois, et celle d'un régime contenant uniquement des globulines purifiées, montre des valeurs plus élevées pour ce dernier régime (87,2 % au lieu de 77,9 %). Les globulines, caractérisées par des structures oligomériques et des masses moléculaires élevées, ne sont donc pas responsables de la faible digestibilité des protéines de pois observée avec certaines variétés de pois.

##### - Effet de la taille des particules de l'aliment

Pour étudier cet effet, nous avons broyé du pois selon deux granulométries très différentes, 920 et 30  $\mu$ m, qui a été incorporé comme unique source de protéine, dans deux régimes appelés 'pois grossier' et 'pois fin' respectivement. La digestibilité fécale apparente est plus faible dans le cas du régime 'pois grossier' (71,0 %)

que dans le cas du régime 'pois fin' (77,9 %). A la fin de l'intestin grêle, les protéines sont moins hydrolysées dans le cas du régime 'pois grossier'. Les proportions de composants azotés de masse moléculaire inférieure à 15 kDa sont plus importantes dans le cas du régime 'pois fin' (75 % au lieu de 66 %). Une granulométrie grossière conduit donc à une plus faible digestibilité des protéines, mais une fine granulométrie entraîne la présence de proportions plus importantes de peptides qui peuvent représenter un facteur limitant de la digestion des protéines.

Au cours de notre travail, nous avons donc mis en évidence trois facteurs limitants de la digestion des protéines de pois : la structure des protéines, la granulométrie des farines, la présence de proportions importantes de peptides en fin d'intestin grêle.

### Travaux en cours (5lignes)

Programme arrêté

### Perspectives (5 lignes)

### Situation de la Recherche : (5 -10 lignes)

- **au plan national** (mentionner si d'autres organismes que l'INRA s'implique dans ce domaine - CNRS, Université, structure privée)

- **au plan Européen**

- **au plan mondial**

#### - Positionnement des équipes INRA dans le contexte international

Contrairement aux études de digestion effectuées jusqu'à présent (méthode de bilan digestif), nous avons développé des méthodologies de biochimie pour étudier le déroulement de la digestion des protéines *in vivo* pour comprendre les mécanismes impliqués dans la variabilité de la digestion. L'analyse des contenus digestifs par des techniques biochimiques (électrophorèse, chromatographie d'exclusion stérique) est effectuée depuis longtemps par différentes équipes chez les mammifères, mais peu d'étude concernent les oiseaux. Par ailleurs, au lieu d'étudier seulement les fractions solubles des protéines (dans des tampons salins), nous avons étudié l'ensemble des protéines (solubilisation avec un détergent, dodécyle sulphate de sodium).

### Remarques Générales :

### Publications récentes (5-10)

- Carré, B., Melcion, J.P., Bourdillon, A., Francesch, M., 1996. The energy values of smooth pea seeds in poultry. *Grain Legumes*, n° 13 : 16-17.
- Carré, B., 1997. The quality of grain legumes for poultry. In : proceedings of 1997 Poultry Science Symposium ; Sydney (AUS), 02/1997, vol 9 :46-53. WPSA, Sydney (AUS). (Texte intégral).
- Carré, B., 1997. Les qualités des graines de légumineuses en nutrition aviaire. In : 2<sup>ème</sup> Journées de la Recherche Avicole ; Tours (FRA) ; 1997/04/08-10, Tome 1 : 27-32. ITAVI, Paris (FRA).
- Carré, B., Melcion, J.P., Widiez, J.L., Biot, P., 1998. Effects of various processes of fractionation, grinding and storage of peas on the digestibility of pea starch in chickens. *Animal Feed Science and Technology*, 71, 19-33.
- Créviu, I.; Bérot, S.; Guéguen, J. 1996. Large scale procedure for fractionation of albumins and globulins from pea seeds. *Nahrung*, 40:237-244.
- Créviu, I.; Carré, B.; Chagneau, A.M.; Quillien, L.; Guéguen, J.; Bérot, S. 1997. Identification of resistant pea proteins in the digestive tract of chickens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45:1295-1300.
- Créviu, I.; Carré, B.; Chagneau, A.M.; Guéguen, J.; Melcion, J.P. 1997. Effect of particle size of pea flours on the digestion of proteins in the digestive tract of broilers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75:217-226.
- Créviu-Gabriel, I.; Gomez, J.; Guéguen, J.; Quillien, L.; Bérot, S.; Carré, B. 1998. Biochemical approach of protein digestion in chickens. In : Symposium Franco-Polonais : Développement des Processus d'Adaptation Digestive et Métabolique chez l'Animal en Croissance : Aspects Nutritionnels et Physiopathologiques; Paris (FRA); 1998/06/23-24, C9. Centre Scientifique de l'Académie Polonaise, Paris (FRA). (Résumé).

Créviu-Gabriel, I.; Carré, B. ; Gomez, J.; Quillien, L.; Guéguen, J.; Bérot, S.; Melcion, J.P. 1998. Pea (*Pisum sativum*) protein digestion in broilers. In : 3rd European Conference on Grain Legumes : Opportunities for high quality, healthy and added-value crops to meet european demands ; Session II : Human and animal nutrition ; Valladolid (Spain) ; 1998/11/14-19, 14-15. (Texte intégral)

Créviu-Gabriel, I.; 1999. Digestion des protéines végétales chez les monogastriques. Exemple des protéines de pois. *INRA Productions Animales*, 12, 147-161.

## INRA - Groupe Filière Protéagineux

### Inventaire des programmes de recherches pour la période 1995-1999

#### Intitulé du Programme de Recherche :

**FACTEURS DE VARIATION DE LA VALEUR PROTEIQUE ET ENERGETIQUE DES GRAINES DE LEGUMINEUSES CHEZ LE PORC**

#### Objectifs :( 5 lignes)

Valeur énergétique des graines de légumineuses chez le porc en croissance et la truie.

Valeur nutritionnelle des protéines de pois: incidence des pertes endogènes spécifiques des graines de pois sur la digestibilité iléale vraie et la disponibilité vraie des acides aminés. Rôles des fibres cotylédonaire et du facteur antitrypsique dans le déterminisme de la disponibilité des acides aminés.

#### Equipes

Intitulé des Unités	Dept	Statut et nombre de chercheurs /an *					
			1995	1996	1997	1998	1999
Station de Recherches porcines (SRP), Centre de Rennes-St-Gilles	ENA	INRA		1	1.5	1	1
		Thésards Post-doc CDD		1	1	1	1

#### Contrats sur la période 1995-1999

Equipe contractante	INRA	Partenaires professionnels	Partenaires « recherche »	Origine du financement	Période
SRP-Rennes		Ralston Purina Europe (Agribrands)		Cofinancement INRA-partenaire pro	96-98
Améliorations plantes Dijon			INRA Phytec Nantes	AIP ALIMAN	96-98
SRP-Rennes		Organismes australiens	South Australian R&D institute		97
SRP-Rennes		UNIP Sanders Seghers (Belgique) Agribrands Europe France	FBN Rostock FUSA Gembloux	Projet Européen FAIR AMINOPIG coordonné par INRA	97-2000

#### Autres collaborations nationales et internationales sur le thème :

John Innes Centre Norwich (England). Accord pour mise en culture et marquage à l'azote <sup>15</sup>N de 2 pois isogéniques, l'un dépourvu de facteur antitrypsique, l'autre enrichi. Les essais sont prévus en 2000 avec la participation de l'UNIP

### Résultats majeurs : (15-20 lignes)

La digestibilité iléale des protéines et des acides aminés du pois est beaucoup plus variable d'une variété à l'autre que la valeur énergétique. Les pertes endogènes, mesurées par marquage des protéines à l'azote  $^{15}\text{N}$  sont également très variables. Les contributions respectives de ces pertes endogènes et de la fraction alimentaire indigestible à l'indigestible apparent total sont indépendantes. La plage importante de variation des pertes endogènes spécifiques des variétés de pois étudiées permet d'évaluer leur impact sur le bilan azoté de l'animal. Nous avons ainsi pu mettre en évidence un coût métabolique additionnel des pertes endogènes spécifiques affectant de manière importante la disponibilité vraie des acides aminés essentiels. Le classement des variétés n'est pas le même lorsqu'on utilise le critère digestibilité iléale apparente de l'acide aminé limitant et un critère "disponibilité vraie" élaboré à partir de l'estimation du coût métabolique des pertes endogènes. Le modèle pois est donc particulièrement intéressant pour valider un nouveau concept d'évaluation nutritionnelle des protéines prenant en compte les pertes endogènes spécifiques des matières premières et leur coût métabolique. Un travail équivalent sur trois variétés de féveroles démontre également l'importance des pertes endogènes spécifiques mais peu de différence entre variétés.

La variété australienne de lupin étudiée (*Lupinus angustifolius*, variété Gungurru) est bien tolérée par le porc jusqu'à un taux de 25 % dans la ration. Les valeurs énergétiques, déterminées pour le porc en croissance et la truie, de la graine et de l'amande sont intermédiaires entre celles d'un pois et celle d'une féverole. Les valeurs sont plus élevées pour la truie adulte que pour le porc en croissance car celle-ci utilise une partie de l'énergie des coques dans son gros intestin. La digestibilité iléale de l'azote, semble plus élevée que celles des pois ou des féveroles

### Travaux en cours (5 lignes)

Le protocole d'étude des pois isogénique 0/+ facteur antitrypsique est en cours d'élaboration pour une expérimentation de mesure des pertes iléales endogènes spécifiques au premier semestre 2000.

### Perspectives (5 lignes)

Nous devrions porter nos efforts sur l'identification des facteurs responsables de la mauvaise digestibilité de certaines variétés de pois, qui semble s'accroître lorsque les conditions de culture ne sont pas optimales. Le dépouillement des données multidisciplinaires de l'AIP ALIMAN devrait permettre d'avancer dans cette voie.

Par ailleurs, les études sur l'évaluation des protéines pour le porc vont s'orienter vers l'incidence de la technologie au cours des 3 prochaines années dans le cadre de la préparation d'une nouvelle thèse cofinancée par Agribrands, en collaboration avec le laboratoire Phytex (Nantes). Dans l'hypothèse d'un cofinancement interrégional la collaboration sera étendue au LBTP (Nantes). Nous étudierons les effets de la granulométrie après broyage et l'interaction avec la granulation ses régimes sur l'utilisation digestive des protéines de graines de pois et de céréales.

Chez le porc, la teneur des protéines en tryptophane disponible constitue une limite majeure à l'utilisation du pois. Des discussions sont en cours avec les industriels concernés la supplémentation en L-tryptophane industriel des régimes à forte teneur en pois. Des recherches pourront donc être entreprises sur les conditions et les conséquences de cette la supplémentation (type de régime, rendement d'utilisation et acides aminés limitants suivants, tels que isoleucine et valine).

### Situation de la Recherche : (5 -10 lignes)

#### - au plan national

Les études sont réalisées en collaboration avec d'autres laboratoires INRA (Laboratoire des légumineuses, Dijon, Phytex et LBTP Nantes), les professionnels de la filière (UNIP) et les industriels de l'alimentation (Agribrands France, Glon-Sanders). Nous avons un contact avec le John Innes Centre Norwich (England).

#### - au plan Européen

Les études sont réalisées en collaboration avec d'autres instituts scientifiques européens tels que FBN Rostock en Allemagne, FUSA Gembloux en Belgique, et un partenaire industriel belge (Seghers)

### - au plan mondial

En Australie on produit du pois et du lupin. Des contacts existent avec des équipes australiennes tant au niveau scientifique ( South Australian R & D Institute) que professionnel (Grains R & D corporation). Le pois est également produit et utilisé au Canada. Nous n'avons des contacts avec les équipes concernées (Guelph university en Ontario et Alberta University). Les Sociétés produisant du L-tryptophane, principalement japonaises, sont particulièrement intéressées à l'utilisation du pois.

### - Positionnement des équipes INRA dans le contexte international

Notre équipe est bien placée en Europe. Nous avons coordonné deux projets européens incluant l'évaluation nutritionnelle des protéines, dont les protéagineux (CAMAR et AMINOPIG). Elle est reconnue hors Europe, au Canada et en Australie.

### Remarques Générales :

Le développement de l'utilisation du pois dans l'alimentation du porc est assez fortement dépendant de sa teneur en tryptophane disponible. On peut donc envisager des recherches sur l'augmentation de sa richesse en tryptophane. Toutefois, les projets de constructions d'usines productrices de L-tryptophane sont assez avancés. Une usine produit déjà du tryptophane pour l'alimentation animale au Mexique. L'intérêt de lancer des projets d'amélioration génétique dans ce sens est fortement dépendant de la réussite commerciale de ces projets industriels au cours des deux ou trois années à venir. Alternativement l'amélioration génétique et l'adaptation des techniques agronomiques devraient viser une amélioration de la digestibilité et de la disponibilité des protéines et des acides aminés.

### Publications récentes (5-10)

- Bourdon D., Perez J.M., Noblet J. (1996). Energy value of peas and faba beans for pigs. *Grain Legumes*. N°13, pp. 14-15.
- Hess, V. and Sève, B. (1998a). Ileal endogenous losses and real digestibility of nitrogen and amino acids of four pea varieties in growing pigs. *3<sup>rd</sup> Conference on Grain Legume*. 14-19 Nov. 1998, Valladolid, Spain.
- Hess V., Thibault J. N., Sève B. (1998b). The 15N amino acid dilution method allows the determination of the real digestibility and of the Ileal endogenous losses of the respective amino acid in pigs. *J. Nutr.*, 128 1969-1977
- Hess, V., Thibault, J.N., Duc, G., Melcion, J.P., Van Eys, J. and Sève, B. (1998c). Influence de la variété et du microbroyage sur la digestibilité iléale de l'azote et des acides aminés de pois. Digestibilité réelle de l'azote et pertes endogènes spécifiques. *Journées Rech. Porcine en France*, 30, 223-229.
- Noblet J., Mancuso M., Bourdon D., van Barneveld R. (1998). Valeur énergétique du lupin (*Lupinus angustifolius*) pour le porc en croissance et la truie adulte. *Journées Rech. Porcine en France*, 30, 239-243
- Hess, V. 1999. Disponibilité vraie des acides aminés et impact des pertes azotées endogènes spécifiques selon la source de protéines alimentaires chez le porc. Thèse de Doctorat. Université Rennes 1, pp. 164.
- Hess V. Ganier P., Thibault J. N., Sève B. (2000). Comparison of the isotope dilution method for determination of the ileal endogenous losses with labelled diet and labelled pigs. *Br. J. Nutr.*, in press
- Hess V., Sève B., Langer S., Duc G. (2000). Impact des pertes endogènes iléales sur la rétention azotée corporelle. Vers un nouveau système d'évaluation des protéines. *Journées Rech. Porcine en France*, 32, sous presse.

# INRA - Groupe Filière Protéagineux

## Inventaire des programmes de recherches pour la période 1995-1999

### Intitulé du Programme de Recherche :

#### DIGESTION DES PROTEINES DE PROTEAGINEUX (POIS, LUPIN) PAR LE RUMINANT

#### Objectifs :( 5 lignes)

Permettre une meilleure valorisation des protéines par le ruminant en :

- précisant la nature des protéines dégradées au niveau ruminal, et la disponibilité des produits de dégradation
- cherchant par des traitements technologiques (broyage, tannage, extrusion) ou par la sélection végétale à diminuer la quantité de protéines dégradées au niveau ruminal sans toutefois modifier la digestibilité intestinale de ces protéines.

### Equipes

Intitulé des Unités	Dept		Statut et nombre de chercheurs /an *				
			1995	1996	1997	1998	1999
Unité de Recherches sur les Herbivores (INRA-Theix)	ENA	INRA Thésard Post-doc CDD	2	3	3	3	3
Laboratoire associé de Nutrition et Alimentation (INRA-Paris)	ENA	INRA Thésard Post-doc CDD	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
Laboratoire associé de Sciences Animales (INRA- Nancy)	ENA	INRA Thésard Post-doc CDD			1 1	1 1	1 0.5

### Contrats sur la période 1995-1999

Equipe INRA contractante	Partenaires professionnels	Partenaires « recherche »	Origine du financement	Période
Unité de Recherches sur les Herbivores	UNIP Tanin Intern. GIE Euretec		Prestations de service	1996-1997 1997-1998
Laboratoire associé de Nutrition et Alimentation	GIE Euretec	Lab. de Technologie Appliquée à la Nutrition		1994-1999
Laboratoire associé de Sciences Animales		Station d'Amélioration des Plantes Laboratoire associé de Nutr. et Alim.	Prestations de service	1998 et 1999 1997

### Autres collaborations nationales et internationales sur le thème :

### Résultats majeurs : (15-20 lignes)

Les protéines de graines de protéagineux se caractérisent une vitesse de dégradation élevée dans le rumen, ce qui limite leur utilisation par le ruminant (faible valeur en PDIA). Les résultats obtenus ont permis :

- d'étudier les variations de fermentescibilité *in vitro* des différentes fractions du pois et de les relier à leurs caractéristiques physiques et chimiques.
- de quantifier la contribution de la fraction alimentaire soluble dans le rumen aux flux d'azote alimentaire à l'entrée de l'intestin grêle, fraction qui n'est pas actuellement prise en compte dans l'évaluation de la valeur PDI des ces aliments.
- d'identifier les fractions qui expliquent l'importance et la vitesse de dégradation élevée des protéines dans le rumen, et de caractériser les vitesses de libération et d'utilisation des produits de l'hydrolyse des protéines de pois par les bactéries du rumen.
- d'évaluer l'intérêt nutritionnel de différents traitements (broyage, tanage, extrusion) sur la quantité de protéines dégradées au niveau ruminal, et la quantité de protéines d'origine alimentaire et microbienne absorbées au niveau de l'intestin grêle.
- d'évaluer le comportement variétal du pois dans le rumen afin de rechercher, en relation avec les sélectionneurs, des variétés dont la résistance à la dégradation ruminale leur permettra d'être mieux valorisées par le ruminant.

### Travaux en cours (5lignes)

- Identification des protéines extraites de pois de différentes variétés et impact de la nature de ces protéines sur leur dégradation ruminale ;
- Influence des facteurs intrinsèques (variété) et extrinsèques (milieu) sur la quantité de protéines, d'origine alimentaire ou microbienne, absorbées au niveau de l'intestin grêle.

### Perspectives (5 lignes)

A terme, ces études doivent conduire à approcher plus précisément la valeur azotée réelle des aliments, à adapter les traitements technologiques à la matière première, et à sélectionner des variétés adaptées à une meilleure valorisation par le ruminant.

### Situation de la Recherche : (5 -10 lignes)

#### - au plan national

Ces programmes sont soutenus par le GIE-Euretec qui regroupe l'inter-profession (UNIP, ITCF) et des industriels de l'alimentation animale.

#### - au plan Européen

#### - au plan mondial

#### - Positionnement des équipes INRA dans le contexte international

### Remarques Générales :

Les programmes menés sur les interrelations milieu x variété nécessiteraient probablement une plus forte interaction avec l'UBTP (INRA-Nantes) et la SAP (INRA-Dijon).

### Publications récentes (5-10)

REMOND D., AUFRERE J., BERNARD L., PONCET C., PEYRONNET C. (1997). Valeur azotée des graines de légumineuses protéagineuses : dégradabilité dans le rumen des protéines du pois, cru ou extrudé, et du lupin. *Renc. Rech. Ruminants*, 4, 133-136.

- PONCET C., REMOND D., (1997). Nitrogen value of leguminous seeds for ruminants. *Grain Legumes*, 17, 20-21.
- MAAROUFI C., MELCION J.P., Le DESCHAULT de MONREDON F., GIBOULOT B., GUIBERT D., CHAPOUTOT P., GIGER-REVERDIN S., SAUVANT D., LE GUEN M.P. (1998). Grinding classification of pea seeds. *3<sup>rd</sup> Eur. Conf. Grain Legumes*, Valladolid, Espagne, 448-449.
- MAAROUFI C., CHAPOUTOT P., GIGER-REVERDIN S., SAUVANT D., MELCION J.P., Le DESCHAULT de MONREDON, GIBOULOT B., GUIBERT D., LE GUEN M.P. (1998). Influence of pea particle sizes on the gas production kinetic with rumen juice (HFT method). *3<sup>rd</sup> Eur. Conf. Grain Legumes*, Valladolid, Espagne, 452-453.
- PONCET C., REMOND D., BERNARD L., PEYRONNET C. (1998). Nitrogen value of protein rich leguminous seeds in ruminants : ruminal degradability of raw and extruded pea and lupin. *3<sup>rd</sup> Eur. Conf. Grain Legumes*, Valladolid, Espagne.
- GIGER-REVERDIN S., BONTEMS V., MAAROUFI C., MELCION J.P., 1999. Influence de la granulométrie sur le pouvoir tampon intrinsèque du pois. *Renc. Rech. Ruminants*, 6, (in press).
- MAAROUFI C., MELCION J. P., DE MONREDON F., GIBOULOT B., GUIBERT D., LE GUEN M.-P., 1999. Fractionation of pea flour with pilot scale sieving. I- Physical and chemical characteristics of pea fractions. *Anim. Feed Sci. Technol.* Accepté pour publication.
- MAAROUFI C., CHAPOUTOT P., GIGER-REVERDIN S., SAUVANT D., LE GUEN M.-P., 1999. Fractionation of pea flour with pilot scale sieving. II. Effect of particle size on the *in vitro* fermentation of pea seed fractions. *Anim. Feed Sci. Technol.* Accepté pour publication
- PONCET C., REMOND D., LE GUEN M.P. (1999). Dégradabilité ruminale et valeur azotée du lupin cru et extrudé. *Renc. Rech. Ruminants*, 6, (in press).